

Titre: Comportement d'un réacteur à sol immobilisé en conditions
méthanotrophes pour la biodégradation du trichloroéthylène

Auteur: Stéphane Pierre

Date: 1997

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Pierre, S. (1997). Comportement d'un réacteur à sol immobilisé en conditions
méthanotrophes pour la biodégradation du trichloroéthylène [Mémoire de
maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/6732/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/6732/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:**
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

COMPORTEMENT D'UN RÉACTEUR À SOL IMMOBILISÉ EN CONDITIONS
MÉTHANOTROPHES POUR LA BIODÉGRADATION DU
TRICHLOROÉTHYLÈNE

STÉPHANE PIERRE

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

NOVEMBRE 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-33177-6

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

COMPORTEMENT D'UN RÉACTEUR À SOL IMMOBILISÉ EN CONDITIONS
MÉTHANOTROPHES POUR LA BIODÉGRADATION DU
TRICHLOROÉTHYLÈNE

présenté par: PIERRE Stéphane

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. GUY, Christophe Ph.D., président

M. RAMSAY, Bruce Ph.D., membre et directeur de recherche

M. KARAMANEV, Dimitar Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. GROLEAU, Denis Ph.D., membre

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Bruce Ramsay, pour m'avoir accepté dans son groupe de recherche et pour son soutien et sa grande disponibilité tout au long du projet. De plus, je tiens à remercier mon codirecteur, Dimitar Karamanev, pour tous ses apports scientifiques au cours du projet et de sa disponibilité.

Je tiens également à remercier Manon Leduc pour son aide logistique et technique ainsi que Yanick Matteau pour son aide technique. Je tiens, par la suite, à remercier Denis Bourque de l'Institut de Recherche en Biotechnologie pour son apport scientifique.

Je remercie également les partenaires de la Chaire industrielle CRSNG sur les bioprocédés d'assainissement des sites pour leur soutien financier grandement apprécié.

Je remercie tous mes collègues de travail et amis pour l'ambiance de travail et leur soutien moral. Je remercie particulièrement Chantal Lafontaine pour ses encouragements. Finalement, je remercie ma chère Vénus et ma famille que j'adore beaucoup.

Résumé

Le trichloroéthylène (TCE) est un hydrocarbure chloré aliphatique fréquemment retrouvé dans les déchets industriels qui contaminent le sol et les eaux souterraines. L'enzyme méthane mono-oxygénase soluble (MMOs) produite par les bactéries méthanotrophes est utilisée pour l'oxydation du méthane. Cette enzyme montre peu de spécificité vis-à-vis son substrat et peut aussi oxyder une variété de substances organochlorées dont le TCE. Le bioréacteur à sol immobilisé est performant pour la minéralisation des contaminants aqueux tel que le pentachlorophénol (PCP). L'immobilisation du sol diminue la friction entre les particules de sol et favorise le développement de la flore microbienne indigène de même que le développement d'un biofilm. L'objectif principal du projet était de développer un procédé utilisant le concept de réacteur à sol immobilisé avec un consortium méthanotrophe pour la dégradation du TCE. Un procédé en laboratoire a été développé avec trois sections distinctes : une unité pour l'ajout de la solution nutritive et du TCE, une unité de méthanation pour l'ajout du méthane et un réacteur à sol immobilisé.

Avant l'injection de TCE dans le réacteur, des essais de minéralisation en microcosmes ont démontré que le consortium méthanotrophe provenant de la phase aqueuse du réacteur avait la capacité de dégrader le TCE à un taux de dégradation initial de $0,11 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ pour une concentration de TCE de 15 mg L^{-1} . Le taux initial de dégradation du

TCE a augmenté avec la concentration initiale de TCE tandis que le pourcentage de minéralisation a diminué. Le rapport entre les bactéries méthanotrophes (11 900 UFC ml^{-1}) et les bactéries hétérotrophes (5 200 UFC ml^{-1}) de la phase aqueuse du réacteur était de 2,29.

Une étude du transfert de masse a été effectuée pour caractériser l'unité de méthanation. Une augmentation de la vitesse d'agitation de l'unité de méthanation de 50 à 300 tr min^{-1} entraînait une augmentation du k_La pour le méthane de 0,08 h^{-1} à 0,3 h^{-1} . Lors de l'adaptation des bactéries sur le géotextile, il fallait fournir une grande quantité de méthane dans le réacteur pour avoir la croissance maximale des bactéries (une vitesse d'agitation élevée et un temps de résidence court dans le méthanateur).

Un bilan de masse a été effectué sur le TCE dans un réacteur abiotique. Quand le réacteur était opéré comme un système ouvert pour l'ajout de l'oxygène sous forme gazeuse, des pertes non négligeables de TCE, par volatilisation, pouvant atteindre 25 % ont été mesurées. Ce problème a été remédié en utilisant un système d'ajout de l'oxygène sous forme dissoute avec la recirculation des gaz. Ce procédé avec ajout d'oxygène sous forme dissoute et la recirculation des gaz a été utilisé pour la dégradation du TCE en mode continu.

La cinétique de dégradation du méthane en mode cuvée suivait un modèle de Monod avec un K_s moyen de $0,43 \text{ mg CH}_4 \text{ L}^{-1}$ et un taux de consommation maximal de $0,013 \text{ mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. En absence de méthane, le consortium microbien était capable de dégrader le TCE ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) sur une période d'au moins 12 heures avec un taux de $0,016 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Suite à une autre injection de TCE ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) en absence de méthane, le taux de dégradation diminuait et devenait presque nul après 37 heures. Les essais en mode continu (durée de 36 jours) ont montré une augmentation moyenne de 14 % de l'efficacité du bioréacteur pour la dégradation du TCE quand le taux de fourniture de CH_4 diminuait de $0,06$ à $0,028 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. La réaction suivait un ordre 1 dans la partie linéaire du modèle de Monod avec un ratio du taux de consommation maximal sur K_s égal à $21,8 \text{ d}^{-1}$. Le taux de dégradation du TCE augmentait de façon exponentielle avec une diminution du temps de résidence. Le taux de dégradation maximal obtenu était de $230 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ pour une concentration initiale de TCE de 18 mg L^{-1} et un temps de résidence de $0,04 \text{ d}$. L'efficacité du réacteur augmente en fonction du temps de résidence. L'efficacité maximale d'enlèvement du TCE était de 97 % pour un temps de résidence de $0,91 \text{ d}$.

Le réacteur à sol immobilisé avec un consortium méthanotrophe a montré un taux de dégradation du TCE jusqu'à 7 fois supérieur à ceux rapportés dans la littérature avec une efficacité d'enlèvement supérieure de 323 % pour de faibles concentrations de TCE à la sortie du réacteur. Pour des concentrations de TCE élevées à la sortie du réacteur, des

taux de dégradation supérieurs de 9 fois avec une efficacité d'enlèvement plus grande de 307 % ont été obtenus.

Le concept du réacteur à sol immobilisé en conditions méthanotrophes peut être utilisé pour le traitement des eaux souterraines contaminées au TCE en utilisant la méthode «pump and treat». Une unité de biofiltration, utilisant le même consortium, reliée sur la sortie des gaz du réacteur à sol immobilisé pourrait être utilisée pour traiter le TCE qui peut se retrouver dans la sortie d'air.

Abstract

Trichloroethylene (TCE) is a chlorinated aliphatic hydrocarbon frequently found in the industrial waste that may contaminate soil and groundwater. The soluble form of the enzyme methane mono-oxygenase (sMMO) is used by methanotrophs for methane oxidation. This enzyme has low substrate specificity and is also capable of initiating the oxidation of a wide variety of halogenated compounds such as TCE. The immobilized soil bioreactor has been shown to be effective for the mineralization of aqueous contaminants such as pentachlorophenol (PCP). Soil immobilization reduces friction between soil particles and favours the development of an indigenous microbial consortium in the form of a biofilm. The main goal of this project was to develop an immobilized soil bioreactor using a methanotrophic consortium to degrade TCE. A laboratory reactor system was developed which incorporated three separate units : a unit for the addition of TCE and nutrient, a methanator for the addition of methane and the immobilized soil bioreactor.

Before TCE addition to the bioreactor, microcosms mineralization assays showed that the methanotrophic consortium in the aqueous phase of the bioreactor could degrade TCE at an initial rate of $0,11 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for a TCE concentration of 15 mg L^{-1} . The initial TCE degradation rate increased with the initial TCE concentration while the percentage of mineralization decreased. The ratio between methanotrophic bacteria (11

900 CFU ml⁻¹) and heterotrophic bacteria (5 200 CFU ml⁻¹) in the aqueous phase of the reactor was 2,29.

The mass transfer capacity of the methanator was assessed. An increase of the mixing speed in the methanator from 50 to 300 RPM lead to an increase of $k_L a$ from 0,08 h⁻¹ to 0,3 h⁻¹. During the adaptation of the microbial consortium on the geotextile, a large amount of methane was needed in the reactor to maximize bacterial growth (high mixing speed and low residence time in the methanation unit).

A mass balance on TCE was made on an abiotic reactor. When the reactor was operated as an open system with oxygen added in gaseous form, losses of TCE by volatilization of up to 25 % were measured. These losses cannot be neglected nor measured accurately. A system using headspace gas recirculation (oxygen added in dissolved form) was shown to eliminate TCE losses due to volatilization. This system was used for TCE degradation in continuous mode.

Methane degradation kinetic in batch experiments followed Monod's model with an average K_s of 0,43 mg CH₄ L⁻¹ and a maximal degradation rate of 0,013 mg CH₄ L⁻¹ min⁻¹. In the absence of methane, the microbial consortium was able to degrade TCE (0,5 mg L⁻¹) for a period of at least 12 hours with a rate of 0,016 mg L⁻¹ d⁻¹. Following another TCE injection (0,1 mg L⁻¹) in the absence of methane, the degradation rate

decreased and was almost zero after 37 hours. Continuous mode experiments (36 days) showed a 14 % average increase in the bioreactor efficiency for TCE degradation when methane addition rate diminished from $0,060 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ to $0,028 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. TCE degradation followed a first order kinetics in the linear part of Monod's model with a ratio of maximal degradation rate over K_s equal to $21,8 \text{ d}^{-1}$. The TCE degradation rate increased exponentially with a decrease of the residence time. Rates of TCE degradation of up to $230 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for an initial TCE concentration of 18 mg L^{-1} and a residence time of $0,04 \text{ d}$ were measured. The reactor efficiency increased with residence time. The maximal TCE removal efficiency was 97 % for a residence time of $0,91 \text{ d}$.

The methanotrophic immobilized soil bioreactor showed a TCE degradation rate of up to 7 times higher than the results reported in the literature, with an efficiency 323 % greater for low TCE outlet concentrations. For high TCE outlet concentrations, the degradation rates were up to 9 times higher than the best results reported in the literature with a 307 % higher efficiency. The methanotrophic immobilized soil bioreactor could be used to treat TCE-contaminated groundwater using the pump-and-treat method. A biofiltration unit using the same methanotrophic consortium could be used to treat TCE in the air exit stream.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES ANNEXES	XIX
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	XX
INTRODUCTION.....	1
PROBLÉMATIQUE.....	1
OBJECTIFS	3
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	5
1.1 LE TRICHLOROÉTHYLÈNE	5
1.1.1 <i>Propriétés du TCE</i>	6
1.1.2 <i>Toxicité du TCE</i>	8
1.2 DÉGRADATION DU TCE.....	9
1.2.1 <i>Biodégradation du TCE</i>	10
1.2.1.1 Les bactéries méthanotrophes.....	11
1.2.1.2 Autres utilisations des méthanotrophes	13

1.2.2 Mécanismes de biodégradation	14
1.2.2.1 Facteurs influençant la biodégradation du TCE par <i>M. trichosporium</i>	18
1.2.2.1.1 Phénomène de compétition	19
1.2.3 Les applications antérieures pour la dégradation du TCE par des bactéries méthanotrophes	21
1.2.4 Concept du réacteur à sol immobilisé	23
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	27
2.1 MATÉRIEL	27
2.2 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES.....	28
2.2.1 Préparation des milieux.....	28
2.2.1.1 Milieu faible en sel de nitrate	28
2.2.1.2 Milieu LNSM-modifié.....	28
2.2.1.3 Milieu nutritif	29
2.2.2 Enrichissement des bactéries méthanotrophes	29
2.2.3 Identification des bactéries hétérotrophes.....	30
2.2.3.1 Isolement des bactéries dominantes.....	30
2.2.3.2 Identification des bactéries à l'aide de Biolog.....	31
2.2.4 Décompte microbien.....	32
2.3 DESCRIPTION DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL.....	32
2.3.1 Unité pour l'ajout de la solution nutritive et du TCE.....	34
2.3.2 L'unité de méthanation.....	34
2.3.3 L'unité bioréacteur	35
2.3.3.1 Mode cuvée	36
2.3.3.2 Mode continu pour l'adaptation de la flore bactérienne	38
2.3.3.3 Mode continu pour la dégradation du TCE	38
2.4 ESSAIS DE MINÉRALISATION EN MICROCOSMES	40

2.4.1 Préparation des microcosmes.....	40
2.4.2 Échantillonnage et mesure de la minéralisation du TCE.....	42
2.5 MÉTHODES ANALYTIQUES.....	43
2.5.1 Mesure du trichloroéthylène.....	43
2.5.2 Mesure du méthane.....	45
2.6 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ.....	46
2.6.1 Qualité des appareils.....	46
2.6.2 Reproductibilité des échantillons.....	48
CHAPITRE 3: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	49
3.1 ÉTUDES MICROBIOLOGIQUES.....	49
3.1.1 Milieu de culture des méthanotrophes.....	49
3.1.2 Choix du sol employé dans le réacteur à sol immobilisé.....	50
3.1.3 Caractérisation du consortium microbien.....	52
3.1.3.1 Identification des bactéries méthanotrophes présentes dans le sol.....	52
3.1.3.2 Identification des bactéries hétérotrophes présentes dans le sol.....	53
3.1.3.3 Vérification de la biodégradation du TCE par le consortium méthanotrophe.....	54
3.2 ÉTUDE DU TRANSFERT DE MASSE DANS LE SYSTÈME.....	56
3.2.1 Caractérisation de l'unité de méthanation.....	56
3.2.2 Bilan de masse sur le TCE dans un réacteur abiotique.....	60
3.2.2.1 Système avec ajout d'oxygène sous forme gazeuse.....	61
3.2.2.2 Système avec ajout d'oxygène sous forme dissoute.....	62
3.2.3 Immobilisation du sol.....	64
3.3 BIODÉGRADATION DU TCE ET DU CH ₄ DANS UN RÉACTEUR À SOL IMMOBILISÉ EN MODE CUVÉE ET EN CONTINU.....	66
3.3.1 Cinétique de consommation du méthane.....	66

3.3.2 Biodégradation du TCE en absence de méthane	69
3.3.3 Essais en mode continu pour la dégradation du TCE	70
3.3.3.1 Influence du taux de fourniture du CH ₄	72
3.3.3.2 Influence de la concentration de TCE dans l'alimentation et du temps de résidence dans le réacteur	73
3.3.3.3 Cinétique de dégradation du TCE	77
3.3.3.4 Comparaison avec la littérature	80
CHAPITRE 4: CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	82
4.1 CONCLUSION	82
4.2 RECOMMANDATIONS SUR LE PROCÉDÉ DE RÉACTEUR À SOL IMMOBILISÉ	85
4.3 RECOMMANDATIONS SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES	87
BIBLIOGRAPHIE	89
ANNEXES.....	102

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Politique de réhabilitation des terrains contaminés par le TCE	6
Tableau 1.2 Propriétés physico-chimiques du trichloroéthylène	8
Tableau 3.1 Identification des bactéries méthanotrophes du sol.....	53
Tableau 3.2 : Variation du pourcentage de minéralisation et du taux initial de dégradation du TCE en fonction de la concentration initiale de TCE	56
Tableau 3.3 Résultats démontrant l'influence du taux de fourniture du méthane sur l'efficacité du bioréacteur pour la dégradation du TCE.....	73
Tableau 3.4 Comparaison des résultats obtenus par d'autres auteurs utilisant un consortium de méthanotrophes pour la dégradation du TCE en bioréacteur	80

Liste des figures

Figure 1-1 Représentation schématique de la structure du TCE	7
Figure 1-2 Voies métaboliques pour l'oxydation du CH_4	14
Figure 1-3 Schéma de dégradation du TCE et du CH_4	16
Figure 1-4 Utilisation du fer comme cofacteur lors de la dégradation du TCE	17
Figure 1-5 Principe du réacteur à sol immobilisé	24
Figure 2-1 Procédé complet avec des encadrés représentant les principaux points d'échantillonnage	33
Figure 2-2 Réacteur en mode cuvée avec en encadré le point d'échantillonnage.....	37
Figure 2-3 Procédé pour la dégradation du TCE en mode continu.....	39
Figure 2-4 Microcosme pour les essais de minéralisation du TCE.....	41
Figure 3-1 Lac des Atocats du Parc Mont St-Bruno	51
Figure 3-2 Quantité de TCE dégradé en microcosmes par un consortium bactérien en fonction du temps pour diverses concentrations initiales de TCE.....	55
Figure 3-3 Concentration de méthane et le coefficient de transfert de masse, $k_L a$ dans l'unité de méthanation en fonction du temps de résidence	58
Figure 3-4 Concentration de méthane à la sortie de l'unité et le coefficient de transfert de masse en fonction de la vitesse d'agitation de l'unité de méthanation	59
Figure 3-5 Dynamique du système en condition abiotique pour le TCE en système ouvert	61
Figure 3-6 Dynamique du système en condition abiotique pour le TCE en système fermé	63
Figure 3-7 Suivi de la densité optique pour l'immobilisation du sol sur le géotextile pour diverses expériences	65
Figure 3-8 Essais de consommation du méthane par les bactéries d'un réacteur à sol immobilisé en mode cuvée.....	67
Figure 3-9 Essai pour la dégradation du TCE dans un réacteur à sol immobilisé en mode cuvée sans CH_4	70
Figure 3-10 Dégradation du TCE dans un réacteur à sol immobilisé en mode continu .	71

Figure 3-11 Taux de dégradation du TCE par rapport à la concentration de TCE alimentée pour des temps de résidence de 1 d et de 0,5 d.....	74
Figure 3-12 Taux de dégradation du TCE par rapport à la concentration de TCE alimentée pour des temps de résidence de 0,25 d, 0,12 d et 0,04 d	75
Figure 3-13 Taux de dégradation du TCE en fonction du temps de résidence pour des concentrations de TCE alimentées de 1,0 mg L ⁻¹ et de 2,4 mg L ⁻¹	76
Figure 3-14 Efficacité d'enlèvement du TCE en fonction du temps de résidence pour des concentrations de TCE alimentées de 1,0 mg L ⁻¹ et de 2,4 mg L ⁻¹	76
Figure 3-15 : Taux de dégradation du TCE en fonction des concentrations à la sortie du réacteur.....	78
Figure 3-16 Concentration de TCE à la sortie du réacteur en fonction du temps de résidence pour une concentration de TCE alimentée de 2,4 mg L ⁻¹	78
Figure 4-1 Traitement combiné bioréacteur à sol immobilisé et unité de biofiltration avec consortium méthanotrophe pour application industrielle	86
Figure A.1 Courbe de calibration du TCE	104
Figure B.1 Courbe de calibration du CH ₄	106
Figure D.1 Courbe F _θ en fonction du temps	109
Figure D.2. Courbe E _θ en fonction du temps	110

Liste des annexes

Annexe A. Analyse du TCE par chromatographie en phase gazeuse	103
Annexe B. Analyse du méthane par chromatographie en phase gazeuse.....	105
Annexe C. Calcul des incertitudes	107
Annexe D : Calcul du Peclet.....	109
Annexe E. Méthode pour évaluer la quantité de sol utilisé	111

Liste des abréviations et symboles

BTEX	Benzène, Toluène, Éthylbenzène, Xylène
$[n]_{inM}$	Concentration du composant n à l'entrée du méthanateur (mg L^{-1})
$[n]_{inR}$	Concentration du composant n à l'entrée du réacteur (mg L^{-1})
$[n]_{outM}$	Concentration du composant n à la sortie du méthanateur (mg L^{-1})
$[n]_{outR}$	Concentration du composant n à la sortie du réacteur (mg L^{-1})
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
1,1-DCA	1,1-dichloroéthane
1,2-DCA	1,2-dichloroéthane
c-DCE	cis-1,2-dichloroéthène
DCE	Détecteur de capture d'électrons
D.E.	Diamètre externe
D.I.	Diamètre interne
DIF	Détecteur d'ionisation de flamme
DO	Densité optique
t-DCE	trans-1,2-dichloroéthène
dpm	Désintégration par minute
K	Taux de consommation maximal ($\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) ou ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
k_{La}	Coefficient de transfert de masse volumique
K_{oc}	Coefficient d'adsorption sur la matière organique

K_{ow}	Coefficient de partition octanol-eau
K_S	Concentration qui correspond à la moitié du taux maximal (mg L^{-1})
LNSM	Low Nitrate Salt Medium
MMO	Méthane mono-oxygénase
MMOp	Méthane mono-oxygénase particulaire
MMOs	Méthane mono-oxygénase soluble
MN	Milieu nutritif
m/v	Rapport massique sur volumique
RPM	Rotation per minute
r_s	Taux spécifique de dégradation par rapport au substrat
t	temps
τ_M	Temps de résidence à l'intérieur du méthanateur (min)
t_r	Tour
τ_R	Temps de résidence à l'intérieur du réacteur (d)
TCE	Trichloroéthylène
1,1,2-TCA	1,1,2-trichloroéthane
1,1,1-TCA	1,1,1-trichloroéthane
UFC	Unité formant des colonies
V	Volume (L)
V_R	Volume du réacteur (L)

V_m	Volume du microcosme (m^3)
VC	Chlorure de vinyle
v/v	Rapport volumique

Introduction

Problématique

Le trichloroéthylène (TCE) est un hydrocarbure chloré aliphatique fréquemment retrouvé dans les déchets industriels qui contaminent le sol et les eaux souterraines. Il est principalement utilisé dans l'industrie des traitements de surface, notamment pour le dégraissage des pièces métalliques, ainsi que dans l'industrie du nettoyage à sec. Il se retrouve dans l'environnement à la suite de déversements accidentels. Il est présent dans 246 des 1035 sites Superfund (Aziz et al., 1995). Le TCE menace la santé humaine et l'environnement car il est toxique et potentiellement cancérigène. De plus, il persiste dans l'environnement.

Plusieurs traitements ont été étudiés pour remédier aux problèmes de contamination au TCE. Les traitements physiques utilisés pour la décontamination, tel que le barbotage, mènent souvent au transfert de la contamination de l'eau à l'air (Mahaffey et al., 1991 et 1992). Les traitements chimiques sont quant à eux très coûteux (Fliermans et al., 1988). Puis, il y a la possibilité de traitements biologiques (anaérobie ou aérobie) qui sont moins coûteux. Cependant, le TCE de même que d'autres composants chlorés apparentés (dichloroéthène, 1,2-dichloroéthane, etc.) posent un défi difficile lors du

traitement biologique. Contrairement aux hydrocarbures aromatiques alkylés (par exemple, les BTEX), ils ne peuvent pas être utilisés comme substrat primaire pour la croissance des bactéries (USEPA, 1990).

Lors de la dégradation anaérobie, il se produit souvent une biodégradation incomplète, ce qui occasionne l'accumulation de composés intermédiaires toxiques et plus récalcitrants que le composé de départ (par exemple, le chlorure de vinyle (Oldenhuis et al., 1989)). Sous conditions aérobies, le TCE peut être dégradé par un consortium microbien contenant des bactéries méthanotrophes. Il a été démontré que plusieurs bactéries méthanotrophes produisent une forme particulière soluble de l'enzyme méthane mono-oxygénase (MMO). La MMOs montre peu de spécificité vis-à-vis son substrat et peut ainsi attaquer une grande variété de substances organochlorées dont le TCE (Little et al., 1988).

Cependant, les recherches réalisées ont démontré de faibles taux de dégradation et la plupart des scientifiques travaillent à des concentrations de TCE inférieures à celles retrouvées en moyenne dans l'environnement.

Des études ont démontré que le concept du bioréacteur à sol immobilisé était performant pour la minéralisation de contaminants aqueux (ex : PCP) (Karamanev et al., 1996a). Le sol immobilisé favorise le développement de la flore microbienne indigène de même que le développement d'un biofilm. De plus, il diminue la friction entre les particules de sol. L'hypothèse de recherche est qu'un réacteur à sol immobilisé contenant des méthanotrophes pourrait dégrader le TCE en phase liquide.

Objectifs

Ce projet de maîtrise consiste à développer et à étudier un procédé pour la dégradation du trichloroéthylène employant un sol immobilisé contenant un consortium méthanotrophe.

De cet objectif, découlent divers aspects :

- 1- Design et construction d'un réacteur prototype;
- 2- Développement de la culture bactérienne méthanotrophe;
- 3 - Étude du transfert de masse dans le système;
- 4 - Étude de la cinétique de l'utilisation du méthane (CH_4);
- 5 - Étude de la cinétique de l'utilisation du TCE en fonction des concentrations de TCE et de CH_4 .

Ce mémoire est composé de cinq parties. Il débute par une introduction qui résume la problématique suivie de la définition des objectifs. Le premier chapitre concerne la revue scientifique sur le TCE et un résumé des techniques de dégradation. Le deuxième chapitre s'attarde sur la méthodologie utilisée pour réaliser les objectifs. Le troisième chapitre porte sur la discussion des résultats obtenus. Finalement, le tout est suivi d'une conclusion et de recommandations pour des travaux futurs.

Chapitre 1: Revue de la littérature

1.1 Le trichloroéthylène

Le TCE se retrouve dans plusieurs secteurs industriels, tel que l'industrie du textile et du traitement de surface. Les principales causes de rejets dans l'environnement proviennent de déversements accidentels ainsi que de fuites de réservoirs. Le TCE est considéré comme un liquide non-aqueux à densité plus élevée que l'eau (DNAPL, Dense Non-Aqueous Phase Liquid) et se retrouvera principalement dans le sol et les eaux souterraines. Dans les lacs, on peut aussi le retrouver en surface, mais il se volatilise rapidement et peut être dégradé par photo-oxydation. Ce composé se retrouve sur la liste des 129 polluants prioritaires de l'Agence de Protection Environnementale des États-Unis (USEPA), dans la catégorie des composés organiques volatils. Au Québec, des normes s'appliquent sur les concentrations maximales de TCE permises dans l'environnement. Il y a d'abord la politique de réhabilitation des terrains contaminés qui contient une grille de critères indicatifs de la contamination des sols et de l'eau souterraine (basée sur trois plages d'intervention : A, B et C) (Tableau 1.1).

Il y a aussi le règlement sur les déchets solides qui donne un tableau indiquant la concentration maximale pouvant être rejetée dans les eaux d'égouts pluviaux et dans les eaux de lixiviation. Selon ce dernier règlement, la limite maximale est inférieure à 0,5 mg de TCE par litre de déchets liquides ou de lixiviat.

Tableau 1.1 Politique de réhabilitation des terrains contaminés par le TCE

Milieu de contamination	Critère		
	A	B	C
Sol (mg kg ⁻¹ sol)	< 0,4	5	50
Eaux souterraines (µg L ⁻¹)	<1	10	50

Source : Ministère de l'Environnement et de la Faune, 1996

1.1.1 Propriétés du TCE

Le trichloroéthylène est un liquide mobile, incolore, ininflammable avec une odeur caractéristique semblable à celle du chloroforme (Guide de la chimie international, 1976). C'est un hydrocarbure chloré aliphatique qui possède trois atomes de chlore dans sa structure chimique (Figure 1.1).

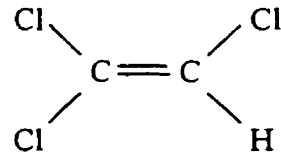


Figure 1-1 Représentation schématique de la structure du TCE

La connaissance des principales caractéristiques physico-chimiques du TCE (Tableau 1.2) est nécessaire pour connaître son déplacement dans l'environnement. Due à sa pression de vapeur élevée, il est un composé très volatil. De plus, le TCE, due à sa solubilité moyenne et à sa densité élevée, tend à se rendre à la nappe phréatique. La faible valeur du coefficient d'adsorption sur la matière organique (K_{oc}) influence le choix de la méthode du « pump and treat » (Russel et al., 1992) pour la récupération du TCE. Il est miscible avec les solvants organiques usuels tel que l'éther et le chloroforme (Merck Index, 1996).

Tableau 1.2 Propriétés physico-chimiques du trichloroéthylène

Propriété	Valeur
Masse molaire	131,39 g mol ⁻¹
Point de fusion	- 84,8 °C
Point d'ébullition (760 mm Hg)	86,7 °C
Solubilité aqueuse à 20 °C	1000 mg L ⁻¹
Pression de vapeur à 20 °C	60 mm Hg
à 30 °C	95,5 mm Hg
Constante d'Henry	8,92 x 10 ⁻³ atm m ³ mol ⁻¹
Densité à 25 °C	1,460 g ml ⁻¹
K _{ow} (log)	2,42
K _{oc} (log)	2,10

Source : Perry et al., (1997) et Merck Index (1996)

1.1.2 Toxicité du TCE

Chez les humains, 25 à 55 % du TCE inhalé est absorbé (Gouvernement du Canada, 1993). Il se distribue dans l'organisme par la circulation sanguine et est métabolisé par les oxygénases à fonctions multiples du cytochrome P450 (Gouvernement du Canada, 1993). Le TCE non métabolisé est évacué par exhalation alors que les produits métaboliques sont rejetés par l'urine. Les effets possibles du TCE sont variés. Sur les

animaux de laboratoire, le TCE administré par inhalation ou par voie orale a démontré un potentiel cancérigène (Gouvernement du Canada, 1993). Les observations ont montré chez la souris des tumeurs au foie et aux poumons et chez les rats, une tumeur testiculaire. Puis, les études sur les humains ont démontré des effets hépatiques et cardio-vasculaires, des troubles rénaux, une pneumatose kystique de l'intestin, des effets neurotoxiques, etc (Gouvernement du Canada, 1993). À partir des indications de cancérigénicité sur les animaux de laboratoire, le TCE a été classé comme une substance probablement cancérigène pour l'homme. Divers chercheurs ont donc entrepris des études pour remédier au problème de contamination du TCE. Les diverses possibilités seront étudiées dans la prochaine section.

1.2 Dégradation du TCE

Le TCE peut être dégradé par plusieurs techniques soit physique, chimique ou biologique. Les traitements thermiques sont utiles quand plusieurs contaminants chimiques organiques et inorganiques se trouvent dans le sol ou les eaux souterraines (Cudahy et Eicher, 1989). Par contre, les traitements thermiques ont des coûts très élevés. Les traitements chimiques sont eux aussi coûteux. Une des méthodes de traitement est l'utilisation du ferrate de potassium (Delucca et al., 1983). Il y a quelques années, il était invraisemblable de croire que le TCE pouvait être biodégradé.

Cependant, le contraire a été démontré et la prochaine section discute des méthodes de biodégradation.

1.2.1 Biodégradation du TCE

La biodégradation du TCE peut être effectuée par deux mécanismes, soit par déchlorination réductive (anaérobie) ou par co-oxydation (aérobie). Le cométabolisme est un processus selon lequel un micro-organisme qui croît sur un composé (substrat primaire) produit une enzyme qui transforme de façon fortuite un autre composé (substrat secondaire) duquel il ne peut obtenir de l'énergie pour sa croissance (Brock et al., 1984).

La première possibilité étudiée pour dégrader le TCE a été la méthode anaérobie par des bactéries méthanogènes. Lors de la dégradation anaérobie, il se produit souvent une dégradation incomplète ce qui occasionne l'accumulation de composés intermédiaires toxiques et plus récalcitrants, tel que le chlorure de vinyle (Parsons et al., 1984).

La première étude qui a démontré qu'un hydrocarbure chloré volatil (TCE) pouvait être biodégradé en conditions aérobies par une souche pure fut effectuée par Wilson et Wilson (1985). Par la suite, il a été démontré qu'une culture mixte de bactéries utilisant du méthane était capable de dégrader le TCE (Fogel et al., 1986). Plusieurs études ont été effectuées sur la possibilité d'utiliser des bactéries utilisant le méthane comme source

de substrat pour la dégradation du TCE. Aussi, les bactéries méthanotrophes peuvent le dégrader sous des conditions psychrophiles (Moran et Hickey, 1997). D'autres types de bactéries peuvent aussi dégrader le TCE : les souches qui expriment la toluène dioxygénase (*Pseudomonas putida* F1 (Wackett et Gibson, 1988; Coyle et al., 1993)) et les souches qui expriment la toluène monooxygénase (*Burkholderia cepacia* G4 (Leahy et al., 1996; Mars et al., 1996), *Pseudomonas aeruginosa* J104 (Koizumi et al., 1995)) et les souches utilisant du butane comme co-substrat (Kim et al., 1997). Cependant, dans tous les cas, les taux de dégradation du TCE obtenus sont plus faibles que ceux obtenus avec des souches de type méthanotrophe.

1.2.1.1 Les bactéries méthanotrophes

Les bactéries méthanotrophes ont des applications prometteuses dans la biorestauration du TCE (Fogel et al., 1986; Little et al., 1988; Oldenhuis et al., 1989; Tsien et al., 1989). La croissance des bactéries méthanotrophes est stimulée par le CH₄ dissous comme donneur d'électrons et l'O₂ dissous comme accepteur d'électrons (Semprini et al., 1991). Les méthanotrophes se divisent en deux types, dépendant surtout de la voie d'assimilation du carbone. Le type I est caractérisé par l'assimilation du carbone par la voie ribulose monophosphate (ex: *Methylococcus capsulatus*), tandis que le type II est caractérisé par l'assimilation du carbone par la voie serine (ex: *Methylosinus trichosporium* OB3b).

Dans les deux cas, l'enzyme MMO produite est responsable de l'oxydation du méthane. La MMO est constituée de trois protéines : l'hydroxylase (site actif de l'enzyme où l'oxygène et le substrat sont mis en contact), la réductase (qui fournit les électrons qu'elle capte du NADH) et la sous-unité β (assure la régulation du transfert d'électrons entre l'hydroxylase et la réductase) (Fox et al., 1989 et 1993; Lipscomb, 1994). Pour quelques méthanotrophes, deux types distincts de MMO sont synthétisés selon la disponibilité du cuivre dans le milieu de culture : une soluble (MMOs) et l'autre particulaire (MMOp) (Stanley et al., 1983; Burrows et al., 1984; Davis et al., 1987). La MMOp est produite quand le milieu de culture est riche en cuivre, tandis que la MMOs est formée quand le milieu est pauvre en cuivre. Par exemple, pour la souche *Methylosinus trichosporium* OB3b, une concentration inférieure à 0,25 μM de Cu est nécessaire pour favoriser la MMOs (Tsien et al., 1989). La MMOp a une spécificité de substrat beaucoup plus étroite mais elle fonctionne avec plusieurs donneurs d'électrons (i.e. NADH, éthanol et succinate) (Shah et al., 1992; Park et al., 1992). La MMOs utilise exclusivement le NADH comme donneur d'électrons. Cependant, la MMO peut changer de la forme particulaire à la forme soluble et vice-versa, tout dépendant des situations. Par exemple, pour une culture en cuvée de *Methylococcus capsulatus* qui est transférée d'un milieu riche en Cu (1 mg L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) à un milieu pauvre en Cu (0,05 mg L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), l'activité de la MMO change graduellement de la forme particulaire à la forme soluble (Dalton et al., 1985).

La MMOs oxyde une large étendue d'hydrocarbures (i.e. n-alcanes, n-alcènes, composés aromatiques et alicycliques). Elle peut cométaboliser le TCE et d'autres composés chlorés (Fennel et al., 1992) tels que le dichloroéthène, le chloroéthène, le dichlorométhane, le chloroforme, le 1,1-dichloroéthane, le 1,2-dichloroéthane. Mais la vitesse de dégradation est différente selon les composés. Des études effectuées par Fogel et al. (1986) et Henson et al. (1988) avec des cultures mixtes utilisant du méthane comme substrat indiquent que les composés aliphatiques les moins chlorés sont dégradés plus rapidement. De plus, Henson et al. (1988) ont démontré que la position des halogènes sur la molécule donne des différences dans le taux et la rapidité de transformation des composés, par exemple $1,2\text{-DCA} > 1,1\text{-DCA}$, $1,1,2\text{-TCA} > 1,1,1\text{-TCA}$. Dans l'étude de Semprini et al. (1990), le t-DCE est dégradé plus rapidement que le c-DCE. On observe que plus les ions chlore sont éloignés les uns des autres, plus le taux de dégradation est élevé (Semprini et al., 1990). Le TCE est plus difficile à dégrader, car il possède un chlore de plus que le DCE. Il y a donc plus d'interactions entre les ions chlore. Le tétrachloroéthylène (PCE) n'est pas dégradé par les bactéries méthanotrophes (Fox et al., 1990).

1.2.1.2 Autres utilisations des méthanotrophes

Les méthanotrophes en plus d'être utiles pour la décontamination du TCE et d'autres hydrocarbures chlorés peuvent servir dans la production de méthanol et de divers époxydes d'alcènes. Le méthanol est très attrayant dû à ses grandes possibilités

d'utilisation comme un carburant alternatif propre et comme matière première pour la synthèse d'octane amplifié pour améliorer l'essence. Parmi les époxydes d'alcènes, l'oxyde de propylène a une valeur commerciale importante (Park et al., 1991). La formation de poly-hydroxy-butyrat (PHB) (Asenjo et al., 1985 et 1986; Henrysson et McCarty, 1993) est aussi intéressante.

1.2.2 Mécanismes de biodégradation

Les bactéries méthanotrophes obtiennent leur énergie et le carbone pour la croissance par métabolisme en réduisant le méthane. Deux possibilités sont envisageables pour la voie d'assimilation du carbone, la voie serine et la voie hexulose phosphate (ribulose monophosphate) (Figure 1.2).

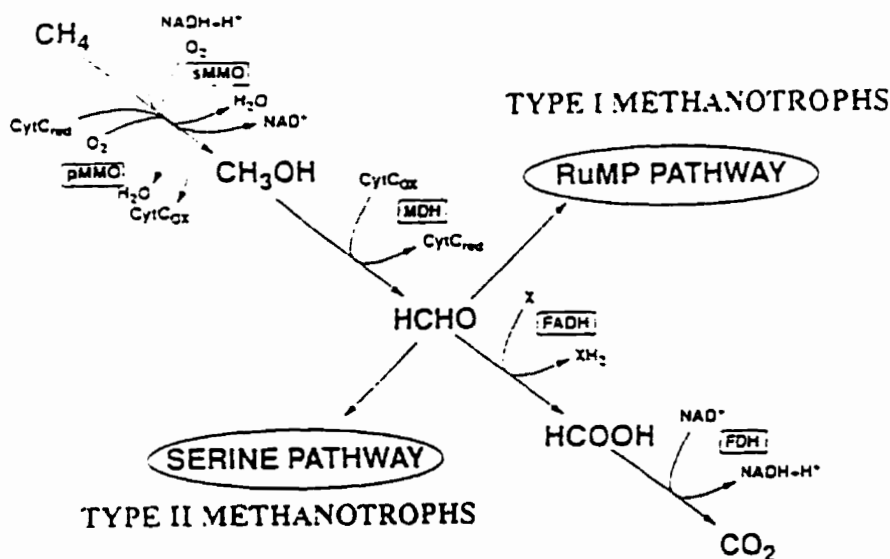
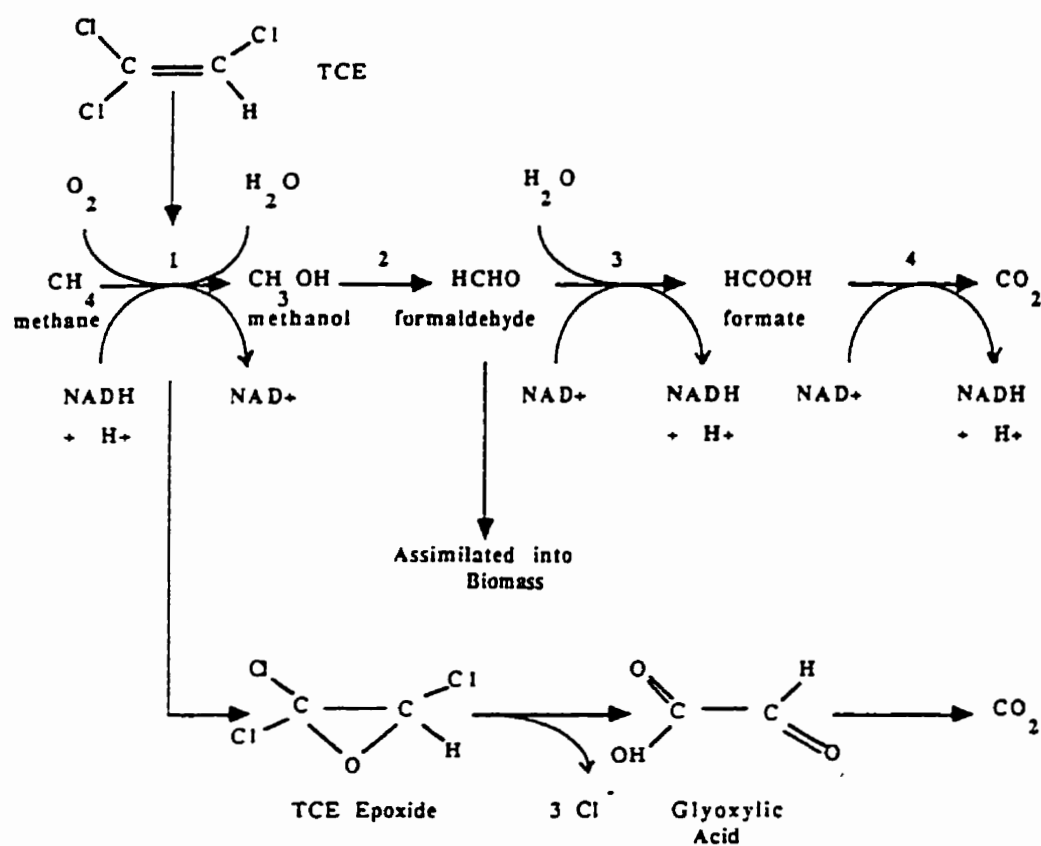


Figure 1-2 Voies métaboliques pour l'oxydation du CH_4
Source : Hanson et Hanson, (1996)

Lors de l'étape de dégradation du TCE par les méthanotrophes, le processus du cométabolisme est appliqué (Figure 1.3). Le méthane sert de donneur d'électrons, l'oxygène comme accepteur d'électrons et le NADH comme agent réducteur. L'enzyme MMOs effectue l'étape de dégradation du TCE en deux composés, soient : le dihydroxytrichloroéthane (5 %) et l'époxyde de trichloroéthylène (95 %) (Liu et al., 1997). Le dihydroxytrichloroéthane se transforme en trichloroacétate pour ensuite se transformer en CO_2 , en chlorure et en oxalate. L'époxyde de trichloroéthylène est très instable et est transformé rapidement jusqu'en dichloroacétate, CO, formate, chlorure et glyoxylate avec l'enzyme MMOs et la présence d'autres hétérotrophes. Il y a essentiellement formation de CO et de formate à partir de l'époxyde de trichloroéthylène. Le dichloroacétate est transformé en glyoxylate et le formate est réduit en CO_2 . L'enzyme MMOs oxyde également le méthane en méthanol, lequel est ensuite transformé en CO_2 . Aussi, le fer est important lors de la dégradation du TCE, car il est utilisé comme cofacteur (Figure 1.4)



Methanotrophic oxidation of methane. Enzymes of interest include: (1) methane monooxygenase; (2) methanol dehydrogenase; (3) formaldehyde dehydrogenase; (4) formate dehydrogenase. Adapted from

Figure 1-3 Schéma de dégradation du TCE et du CH_4
Source : McFarland et al., (1992)

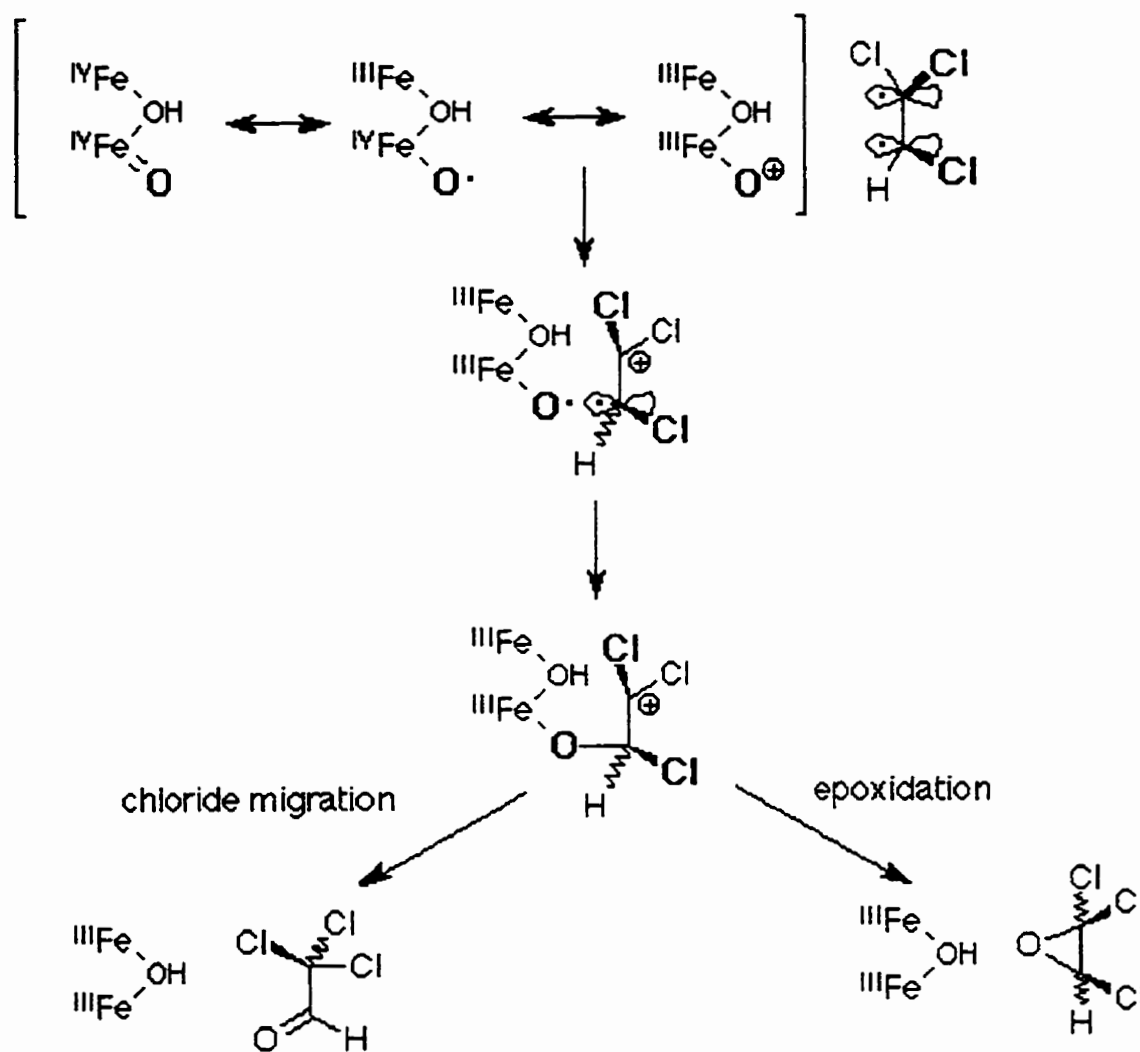


Figure 1-4 Utilisation du fer comme cofacteur lors de la dégradation du TCE
Source : Young, (1997)

1.2.2.1 Facteurs influençant la biodégradation du TCE par *M. trichosporium*

Divers facteurs peuvent influencer la dégradation du TCE. Il a été démontré qu'il existe une différence significative entre un sol enrichi au méthane et un sol non-enrichi pour l'enlèvement de divers composés (TCE, DCE, chloroforme) (Henson et al., 1988). Le méthane de grade technique peut contenir de l'acétylène qui est toxique aux méthanotrophes (Hazen et al., 1993). La température à laquelle s'effectue la dégradation est aussi importante. Une diminution de température augmente la période de latence pour la dégradation (Fan et Scow, 1993). La température maximale pour la croissance des méthanotrophes se situe entre 30 °C et 34 °C. Cependant, l'activité de l'enzyme MMOs est maximale à 30 °C (Brusseau et al., 1990 et Park et al., 1991). La zone idéale de pH se trouve entre 6 et 7. Au-dessus de 7,5, il y a une augmentation de la phase de latence et une diminution du taux de croissance. Une concentration de phosphate supérieure à 40 mM devient inhibitrice pour la croissance des méthanotrophes. La concentration de nitrate pour la croissance doit être supérieure à 1 mM et pour favoriser l'activité de la MMOs, elle doit être supérieure à 2 mM (Bowman et Sayler, 1994). À haute concentration d'ammoniaque (70 mg L⁻¹), il y a inhibition de la consommation du méthane (Boiesen et al., 1993). Le cuivre est un élément important car il a une influence sur la forme de l'enzyme MMO (soluble ou particulaire). Pour avoir la forme soluble de l'enzyme MMO, la concentration de cuivre doit être inférieure à 0,25 µM (Tsien et al., 1989). L'effet du fer (le fer est un cofacteur essentiel pour le site actif de l'enzyme

MMOs) est important sur le taux de consommation du méthane (Boisen et al., 1993). Une concentration en oxygène de 5 mg L⁻¹ est préférable pour maximiser l'activité de la MMOs et une concentration en oxygène de 6 mg L⁻¹ est favorable pour la croissance de *M. trichosporium* OB3b (Bowman et Saylor, 1994). Le CO₂ (20 %), quand il est incorporé au début de la période de croissance, diminue la phase de latence (Park et al., 1991). Les souches de méthanotrophes croissent préférentiellement avec un mélange CH₄:air:CO₂ dans un rapport 5:4:1 (Bowman et al., 1993b). Le propane ne peut pas être utilisé comme source de substrat (Lanzarone et McCarty, 1990) et le méthane à une trop grande concentration (> 4,5 mg L⁻¹) peut être une cause d'inhibition pour la dégradation du TCE car il compétitionne pour le site actif de la MMOs.

1.2.2.1.1 Phénomène de compétition

La compétition inhibitrice due à la présence de méthane a été étudiée de même que la substitution du méthane par d'autres donneurs d'électrons (Semprini et al., 1991). L'étude avait pour but de déterminer si le méthane pouvait être substitué par d'autres donneurs d'électrons (méthanol et formate) pour maintenir la transformation des composés chlorés sans inhibition. Immédiatement après l'addition de méthane et d'oxygène dissous (OD), les concentrations en VC, t-DCE, c-DCE et TCE diminuent, ce qui confirme que l'utilisation active du méthane par les bactéries entraîne une transformation des organochlorés. Une injection pulsée de méthane entraîne une diminution des taux de transformation des composés due à une inhibition. Durant la

période où la concentration en méthane est élevée, les taux de transformation sont réduits. La réponse de ces composés aux pulsations de méthane suggère que les taux de transformation répondent directement aux variations de concentrations de méthane. Une autre explication possible est que lorsque la concentration en méthane est élevée, donc que la concentration en OD est faible, le taux de transformation de ces composés est réduit à cause du manque de OD. Des essais ont été réalisés avec du méthanol et du formate (USEPA, 1990) pour remplacer le méthane comme donneur d'électrons. Le formate fournit une source de pouvoir réducteur pour les méthanotrophes, mais son utilisation ne requiert pas la présence de la MMOs. L'ajout de formate a pour effet d'augmenter le taux de transformation des contaminants et d'arrêter le phénomène d'oscillations. Cependant, pour le TCE, la concentration ne change pas réellement et les oscillations ne diminuent pas de façon significative. De plus, après un certain temps d'addition en continu de formate, les concentrations de t-DCE, c-DCE et TCE augmentent, ce qui implique une diminution du taux de dégradation des contaminants. Ce qui peut être dû soit : à une perte d'activité de la population méthanotrophe parce que le formate est un substrat non utilisé pour la croissance; ou bien les méthanotrophes ont été supplantées par d'autres micro-organismes qui utilisent le formate comme substrat. Pour les bactéries méthanotrophes strictes, le formate est un intermédiaire dans la génération d'énergie à partir du méthane, mais il n'a pas été observé comme étant un substrat pour la croissance. Une autre possibilité est que la MMOs, peut graduellement être désactivée par une addition prolongée de formate. L'utilisation du méthanol comme

donneur d'électron, donne une réponse similaire à celle observée avec le formate. Puis, une étude a été effectuée pour prouver que les populations méthanotrophes requièrent un ajout de pouvoir réducteur pour que la transformation soit maintenue. L'ajout d'eau oxygénée, sans ajout de donneur d'électrons, a montré une diminution abrupte du taux de dégradation des contaminants. Ces études ont démontré que le pouvoir réducteur peut être fourni par le méthane ou par d'autres substrats comme le formate et le méthanol et que la cause de l'inhibition découle surtout de la compétition pour la MMOs.

1.2.3 Les applications antérieures pour la dégradation du TCE par des bactéries méthanotrophes

Cette section décrit brièvement quelques applications pour la dégradation du TCE par les bactéries méthanotrophes. Comme les études sont très variées, passant d'essais en fioles (Chu et al., 1996 ; Henrysson et McCarty, 1993) à des essais en mode cuvée (Lu et al., 1995) et en mode continu (McFarland et al., 1992), cette section sera axée sur les essais en mode continu avec consortium méthanotrophe avec seulement le méthane comme substrat ajouté.

1.2.3.1 Essais en bioréacteur en mode continu

Des études avec des consortiums de méthanotrophes ont été effectuées. Les taux de rendement pour la dégradation du TCE obtenus dans la majorité des cas étaient faibles (Phelps et al., 1990, un taux de $1,43 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Phelps utilisait un lit en expansion avec recirculation du milieu. Lanzaronne et al. (1990) obtenaient eux aussi des taux faibles de dégradation du TCE ($0,33 \text{ mg TCE L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) avec des colonnes remplies de matériel aquifère. Arvin (1991) et Fennel et al. (1993) utilisaient un réacteur avec biofilm fixé. Dans les deux cas, l'efficacité d'enlèvement était faible (23 %). Un des avantages du réacteur avec biofilm fixé est que la production de bactéries et la dégradation du TCE pouvaient s'effectuer dans un seul bioréacteur (Fennel et al., 1993). Le méthane et l'air étaient incorporés séparément à contre-courant sous forme dissoute jusqu'au lit en expansion. Ce design permettait de réduire le risque d'explosion associé au mélange de méthane et d'air. Une autre étude intéressante est celle de Aziz et al. (1995) où l'eau contaminée au TCE passait à travers une membrane à l'intérieur de laquelle circulaient des bactéries. Une souche pure (PP358 de *M. trichosporium* OB3b) était utilisée. Le taux de dégradation maximal obtenu était de $3,38 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ pour de faibles concentrations de TCE ($C_{in}=0,097 \text{ mg L}^{-1}$ et $C_{out}=0,075 \text{ mg L}^{-1}$).

Les principaux problèmes associés aux bioréacteurs en mode continu pour la dégradation du TCE sont la perte de sol lorsqu'il est en suspension et la friction entre les particules

de sol. L'ajout du méthane peut causer des problèmes de compétition pour la MMO. Les taux de dégradation sont faibles par rapport à ceux obtenus avec des souches pures de méthanotrophes.

1.2.4 Concept du réacteur à sol immobilisé

L'utilisation de réacteurs avec du sol en suspension («slurry») pour l'activation des micro-organismes n'est pas très efficace. Les principales raisons de cette inefficacité sont les collisions entre les particules qui empêchent la formation d'un biofilm à la surface de celles-ci et la difficulté de retenir les particules de petite dimension dans le réacteur lorsque le système opère en continu (Karamanev et Nikolov, 1991). Les réacteurs utilisés pour le développement de biofilms doivent respecter certains critères. Le principal critère est une faible contrainte de cisaillement exercée autour du biofilm, surtout durant la période initiale de formation du biofilm. La nature du support pour le biofilm est aussi très importante. Les micro-organismes ont la capacité de former des biofilms sur les surfaces présentes dans leur environnement. La surface des particules de sol devrait donc être un support adéquat pour les micro-organismes indigènes du sol (Otte et al., 1994). Les particules de sol contaminées avec un polluant cible et qui démontrent une activité spécifique de biodégradation pourraient servir comme support pour le développement d'un consortium microbien et comme support pour la formation d'un biofilm. La fixation des particules de sol contaminé contenant une microflore

indigène adaptée au polluant cible permet d'activer cette dernière sous des conditions appropriées. La circulation d'une phase boueuse à travers une membrane poreuse permet d'emprisonner graduellement les particules. Le liquide circule autour de celles-ci de façon laminaire et aucune friction n'est observée. Ces conditions sont optimales pour la croissance d'un biofilm. Le procédé de sol immobilisé est une modification d'un réacteur de type «airlift» (Figure 1.5) (Karamanev et al., 1996b, 1997).

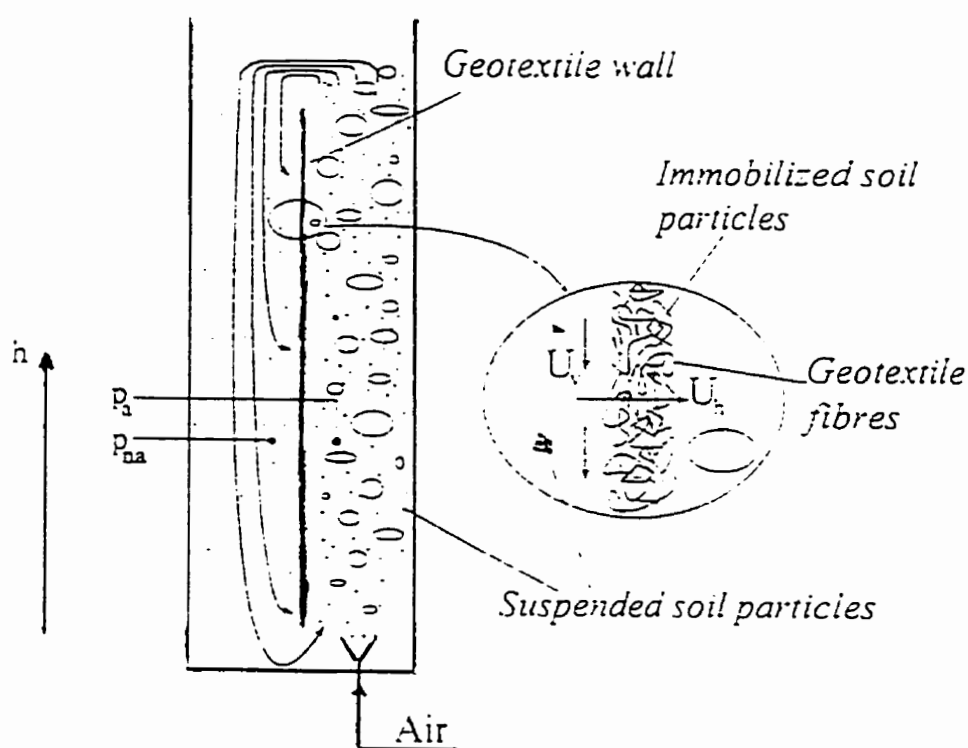


Figure 1-5 Principe du réacteur à sol immobilisé
Source : Karamanev et al., 1996a

Le réacteur est divisé verticalement en deux sections par une membrane semi-perméable en géotextile. Cette membrane permet le passage du liquide tout en retenant les bulles de gaz. Quand une section est aérée, la pression hydrostatique dans la section non aérée est supérieure à celle de la section aérée pour une même hauteur créant ainsi une baisse de pression à travers la membrane. Cette baisse de pression amène le liquide à se déplacer dans les directions horizontale et verticale. Le mouvement du liquide, dans le sens vertical, est ascendant dans la section aérée du réacteur et descendant dans la section non aérée. Cette vitesse verticale pour le mouvement du liquide est non linéaire en fonction de la hauteur. La perte de pression à travers la membrane entraîne aussi un déplacement horizontal du liquide de la section non aérée vers la section aérée à travers la membrane. La vitesse horizontale pour le mouvement du liquide est linéaire en fonction de la hauteur, mais elle décroît avec une augmentation de hauteur. Cette composante horizontale de la vitesse d'écoulement est responsable de l'immobilisation du sol à l'intérieur des pores de la membrane semi-perméable en géotextile. Le temps d'immobilisation des particules de sol augmente avec une diminution du diamètre de celles-ci. Il a été démontré que le réacteur à sol immobilisé avait un comportement hydraulique complètement mélangé (CSTR) (Karamanev et al., 1996a).

Le bioréacteur à sol immobilisé est efficace pour le développement d'un consortium microbien et pour la dégradation de contaminants dissous dans l'eau. La première

application de ce concept a été utilisée pour la minéralisation du pentachlorophénol (PCP) et les résultats obtenus ont été significativement supérieurs à ceux rapportés dans la littérature (7 à 4000 fois). Les taux de dégradation ont atteint jusqu'à 900 mg PCP L⁻¹ h⁻¹ (Karamanev et al., 1996c).

Chapitre 2: Matériel et méthodes

2.1 Matériel

Le TCE, l'hexane de même que les autres produits chimiques (grade laboratoire) provenaient de la compagnie Anachemia de Montréal. Le 1,2-dibromoéthane fut acheté chez Fisher Scientific. Pour les essais de minéralisation en microcosmes, du [^{14}C]TCE d'une pureté $\geq 98\%$ avec une activité spécifique de 5,4 mCi/mM a été utilisé (Sigma Chemicals, St-Louis, MI).

Le méthane (grade CP) de même que le mélange de gaz air:CO₂ (20 % de CO₂ v/v) provenaient de cylindres de gaz comprimé de la compagnie Air Liquide Canada.

La souche pure de *Methylosinus trichosporium* OB3b a été donnée gracieusement par Denis Groleau de l'Institut de Recherche en Biotechnologie.

2.2 Analyses microbiologiques

2.2.1 Préparation des milieux

2.2.1.1 Milieu faible en sel de nitrate (LNSM, « Low Nitrate Salt Medium »)

Le milieu original pour la croissance des bactéries méthanotrophes était constitué de : 1 mM de NaNO_3 , 1 mM de K_2SO_4 , 3,9 mM de KH_2PO_4 , 6,0 mM de Na_2HPO_4 , 0,15 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 47,6 μM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6,0 μM de H_3BO_3 , 2,0 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 μM de KI , 0,4 μM de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 μM de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Cette solution avait un pH de 6,88. Tous les composés ont été pesés à l'aide d'une balance analytique (modèle AB 204 Mettler-Toledo). Lors de la préparation du milieu solide, les mêmes ingrédients étaient utilisés avec un ajout de 1,5 % d'agar noble (Difco, Détroit, MI).

2.2.1.2 Milieu LNSM-modifié

Ce milieu modifié pour la croissance des bactéries méthanotrophes était constitué de : 2 mM de NaNO_3 , 2 mM de tampon phosphate (3,9 mM de KH_2PO_4 et 6,0 mM de Na_2HPO_4), 50 μM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 80 μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cette solution avait un pH de 6,88. Lors de la préparation du milieu solide, les mêmes ingrédients étaient utilisés avec un ajout de 1,5 % d'agar noble (Difco, Détroit, MI).

2.2.1.3 Milieu nutritif

Le milieu nutritif (MN) pour vérifier la présence des bactéries hétérotrophes du sol était constitué de : 8 g L⁻¹ de bouillon nutritif (Becton Dickinson, Cokeysville, MD) et de 15 g L⁻¹ d'agar granulé (Fisher Scientific).

Pour la stérilisation des milieux, les solutions ont été autoclavées pour une période de 20 minutes, à 121 °C, sous une pression de 1 atm.

2.2.2 Enrichissement des bactéries méthanotrophes

Pour enrichir les micro-organismes indigènes du sol, une jarre anaérobie contenant à l'intérieur un Erlenmeyer de 250 ml avec un échantillon de sol a été utilisée. La jarre permettait d'avoir un environnement de CH₄:air:CO₂ dans un rapport de 5:4:1. Le mélange gazeux était circulé à l'intérieur de la jarre durant 2 minutes, en laissant une pression finale positive de 1 bar. Après, la jarre était placée sur un agitateur magnétique dans un incubateur maintenu à 30 °C durant 14 jours (température idéale pour favoriser la croissance des bactéries méthanotrophes). L'échantillon de sol contenu dans l'Erlenmeyer a été filtré à travers un filtre de 1,5 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA). Le filtrat (5 ml) obtenu a été déposé dans une bouteille sérologique de 70 ml (Fisher Scientific) contenant 10 ml de LNSM. La bouteille a été scellée avec une

capsule d'aluminium pré-perforée (dia. = 20 mm) (Wheaton, Millville, NJ) contenant, à l'intérieur, un septum en caoutchouc (dia. = 20 mm) (Wheaton). L'espace vide de la bouteille a été rempli avec un mélange gazeux de méthane:air:CO₂ (5:4:1). Les bouteilles ont été incubées à 30 °C, pour une période pouvant atteindre 21 jours.

2.2.3 Identification des bactéries hétérotrophes

2.2.3.1 Isolement des bactéries dominantes

La préparation de l'inoculum s'effectuait en prenant un échantillon frais soit de sol ou de liquide provenant du réacteur et en le diluant successivement dans des éprouvettes contenant du milieu salin stérile (NaCl à 0,85 % m/v, Anachemia). Ensuite, la méthode d'ensemencement par étalement a été utilisée. Cette méthode consistait à placer l'inoculum (100 µL) au milieu de la gélose (MN pour les bactéries hétérotrophes et LNSM pour les bactéries méthanotrophes) et en utilisant une tige de verre stérile et courbée, l'inoculum était étalé sur la surface de la gélose dans le but de séparer le mieux possible les différentes bactéries. Les géloses ont été incubés à une température de 30 °C. Pour les bactéries méthanotrophes, les plaques de Petri ont été placées à l'intérieur d'une jarre anaérobie contenant un mélange gazeux de méthane:air:CO₂ (5:4:1). Les colonies ont été repiquées puis réensemencées sur une autre plaque par la méthode de l'ensemencement par épuisement (Pelczar Jr. et al., 1982). Puis, il y avait incubation à

30 °C. Les étapes de repiquage et de réensemencement ont été répétées jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Une coloration de Gram a été effectuée sur les cultures pures hétérotrophes isolées.

2.2.3.2 Identification des bactéries à l'aide de Biolog

Les bactéries hétérotrophes isolées ont été identifiées à l'aide du système BIOLOG (Biolog Inc., Hayward, CA, USA). Le principe de cette méthode reposait sur des tests biochimiques colorimétriques. Le patron d'utilisation de 95 substrats différents était comparé statistiquement à une base de données. À partir d'une culture pure fraîche, un inoculum dont la densité optique était ajustée entre 0,24 et 0,29 a été préparé dans de la saline stérile (0,85 % NaCl). 150 µl de l'échantillon liquide a été déposé dans chacun des puits de la microplaque (GN ou GP selon la coloration de Gram) préalablement incubée à 30°C. Les microplaques ont été incubées à 30°C pendant 24h avant d'être analysées. Les puits dont la coloration du milieu était violet ont été considérés positifs. Les résultats ont été interprétés à partir du logiciel Microlog (version 3.50) qui contient 1 118 espèces/groupes.

2.2.4 Décompte microbien

Une suspension bactérienne a été diluée par un facteur de 10 dans un milieu salin (NaCl, 0,85 % m/v) jusqu'à l'obtention d'un facteur de dilution 10^{-6} . 100 μ L de chaque dilution a été déposé sur des géloses (MN ou LSNM selon le type de bactéries à compter) en triplicata. Les plaques de Petri ont été incubées à 30 °C. Le décompte des unités formant des colonies (UFC) a été effectué après une période d'incubation maximale de 7 jours.

2.3 Description du montage expérimental

Le système (Figure 2.1) était constitué de trois unités distinctes, soient : l'unité d'ajout de la solution nutritive et de TCE, le bioréacteur et l'unité de méthanation. Selon le but visé ou l'étude à réaliser, le système avait une configuration différente. Par exemple, pour l'étude de la cinétique de consommation du méthane, le système a été mis en mode curvée.

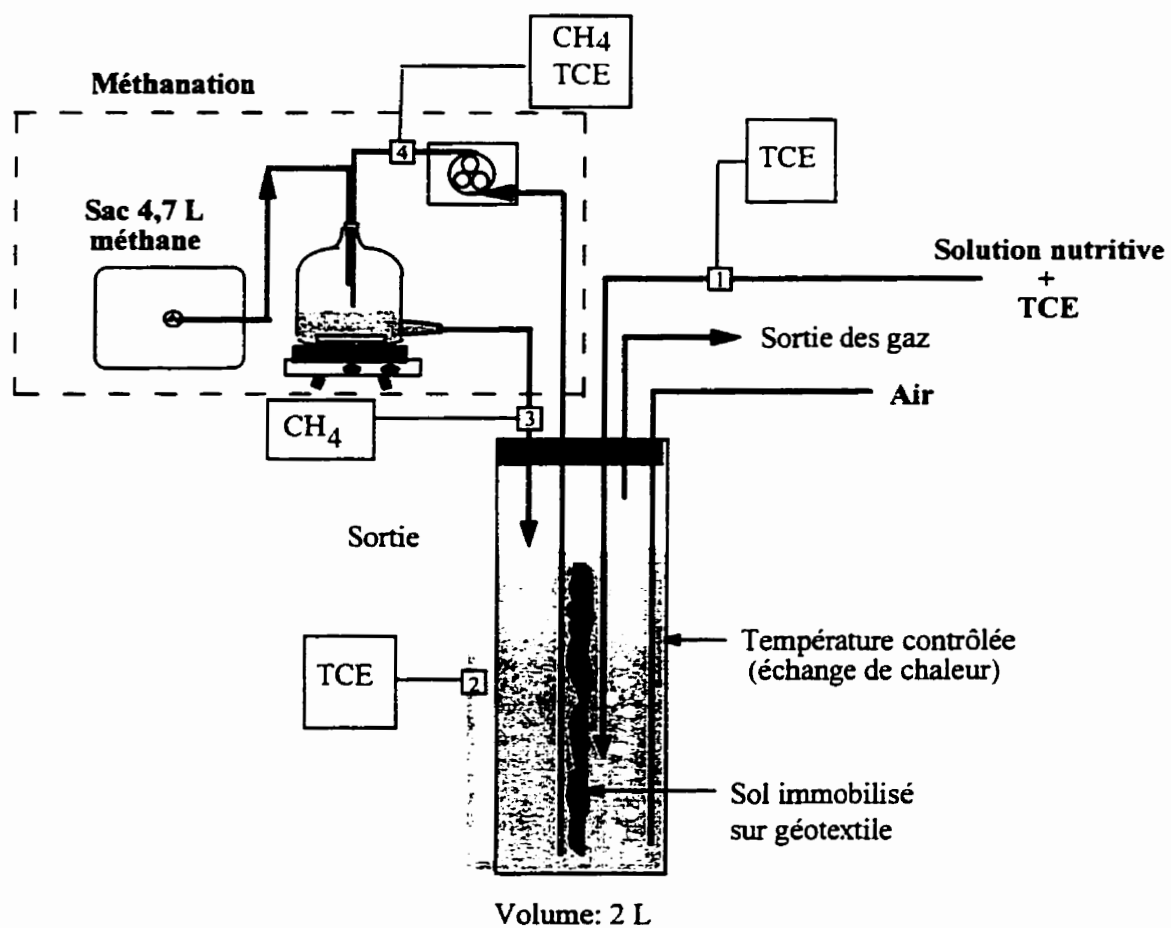


Figure 2-1 Montage complet avec des encadrés représentant les principaux points d'échantillonnage

2.3.1 Unité pour l'ajout de la solution nutritive et du TCE

L'unité utilisée pour l'ajout de la solution nutritive et du contaminant avaient deux aspects différents. Lors de la période du développement de la flore bactérienne une tourie de verre de 23 L a été utilisée pour emmagasiner le milieu nutritif (LNSM-modifié) sans le TCE. Lors de l'ajout de TCE avec la solution nutritive, un sac en Tedlar[®] (Cole Parmer, Vernon Hills, IL) de 20,3 L (45,72 cm x 45,72 cm) a été utilisé. Le sac permettait d'éviter la volatilisation du TCE et maintenait une concentration constante. La cuve servait alors pour l'ajout d'oxygène sous forme dissoute.

2.3.2 L'unité de méthanation

La section méthanation est l'endroit où s'effectuait l'ajout de méthane sous forme dissoute dans le système pour éviter le risque d'explosion. Cette unité n'était fonctionnelle qu'en mode continu du système. Elle était reliée au réacteur principal par des tuyaux en Tygon SE-200 (D.I. = 3,18 mm et D.E. = 6,35 mm) et tous les tuyaux à l'intérieur de l'unité étaient en acier inoxydable (316-SS, D.E. = 3,18 mm). L'unité de méthanation était constituée d'un sac (30,5 cm x 30,5 cm) de Teflon[®] (Cole Parmer) de 4,7 L qui contenait du méthane. Le sac était branché, à l'aide d'une valve en Teflon[®] (Cole Parmer), à une bouteille en verre à double ouverture (« aspirator bottle », V = 1 L) (VWR Canlab, Mississauga, Ont), qui était placée sur une plaque agitatrice. Le transfert

de masse du méthane s'effectuait dans cette bouteille. L'alimentation à la bouteille s'effectuait à l'aide d'une pompe péristaltique Masterflex® (Modèle 7520-25, 6 - 600 tr min⁻¹) reliée à l'unité principale du système. Pour les différentes expériences, le débit de la pompe péristaltique variait entre 27,3 ml min⁻¹ et 230 ml min⁻¹. Le liquide contenant le méthane dissout était retransféré à l'unité principale par le principe du trop-plein ce qui permettait le maintien d'un volume constant à l'intérieur de la bouteille.

2.3.3 L'unité bioréacteur

Cette unité était constituée d'un cylindre de 2 L en verre, fermé par un bouchon de caoutchouc (dimension : dia. inférieur = 77 mm, dia. supérieur = 90 mm, épaisseur = 40 mm). À l'intérieur du cylindre, un géotextile Texel 400 (Texel, St-Elzéar, Québec) (H = 36,4 cm, L = 7,8 cm, E = 0,5 cm) a été installé sur un cadre en acier inoxydable (D.E. = 1,59 mm), et la solution nutritive utilisée était le milieu LNSM-modifié. Un système de contrôle de température par échange de chaleur était constitué d'un tuyau en acier inoxydable (316-SS) (D.E. = 6,35 mm) en forme de U installé dans le réacteur, dans lequel circulait de l'eau provenant d'un bain thermostaté (Brinkman, Modèle T-1) (T = 29,5 °C - 30,8 °C dans le bioréacteur). Tous les tuyaux situés à l'intérieur du réacteur étaient en acier inoxydable. Pour maintenir le volume de liquide à l'intérieur du réacteur constant, le principe du trop-plein a été utilisé. L'agitation et la circulation du liquide à l'intérieur du réacteur ont été réalisées par l'ajout d'air à l'aide d'une pompe à

diaphragme (Hagen inc., Montréal, Québec) lors de l'acclimatation des bactéries ou par la recirculation du gaz de l'headspace du réacteur par une pompe péristaltique en modes cuvée et continu lors de la dégradation du TCE.

Selon le mode de fonctionnement (cuvée ou continu), le réacteur était soit ouvert à l'atmosphère ou fermé. Les deux possibilités sont expliquées dans les sections suivantes.

2.3.3.1 Mode cuvée

Durant le fonctionnement du réacteur en mode cuvée (Figure 2.2), la seule unité fonctionnelle était le réacteur. Le réacteur a été mis en mode cuvée en coupant l'alimentation en nutriments, en méthane et en oxygène. L'agitation a été effectuée par la recirculation du gaz de l'headspace à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de $0,5 \text{ L min}^{-1}$. Une sonde à oxygène (modèle YSI-5739, Yellow Spring Instruments inc., Yellow Spring, OH) a été utilisée pour trouver le ratio d'utilisation de l'oxygène lors de l'étude de la cinétique de consommation du méthane en cuvée. La sonde a été calibrée avec de l'air saturé en eau ($9,09 \text{ mg L}^{-1}$ à 20°C) (Lanzarone et McCarty, 1990). Cette sonde n'a pas pu être utilisée lors des études de dégradation comportant du TCE à cause de l'incompatibilité chimique de la membrane avec le TCE.

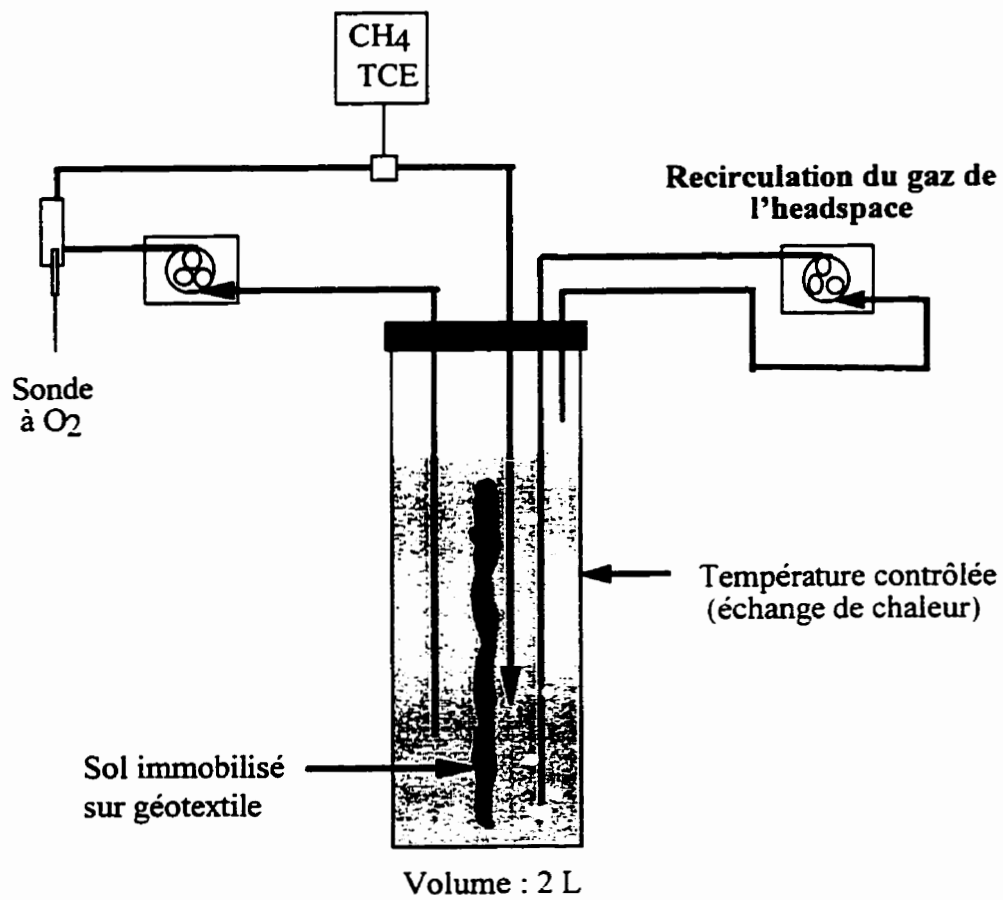


Figure 2-2 Réacteur en mode cuvée avec en encadré le point d'échantillonnage

2.3.3.2 Mode continu pour l'adaptation de la flore bactérienne

Lors de l'adaptation des bactéries sur le géotextile, la partie méthanation était fonctionnelle et l'ajout de nutriments (LNSM-modifié) contenant du Nystatin (Anachemia) (pour éviter la formation d'algues) a été fait à partir d'une tourie de 23 L à un débit de $1,44 \text{ ml min}^{-1}$ ($\tau = 0,92 \text{ d}$). L'ajout d'air provenait d'une pompe à diaphragme reliée à un rotamètre (Cole Parmer). Le débit d'aération était de $0,5 \text{ L min}^{-1}$. De plus, le réacteur était ouvert à l'atmosphère (Figure 2.1).

2.3.3.3 Mode continu pour la dégradation du TCE

Après l'adaptation de la flore bactérienne, pour éviter la perte du TCE par volatilisation, le système était fermé à l'atmosphère en effectuant la recirculation du gaz de l'headspace, en ajoutant l'oxygène sous forme dissoute et en ajoutant le TCE et les nutriments à partir d'un sac en Tedlar® (Figure 2.3).

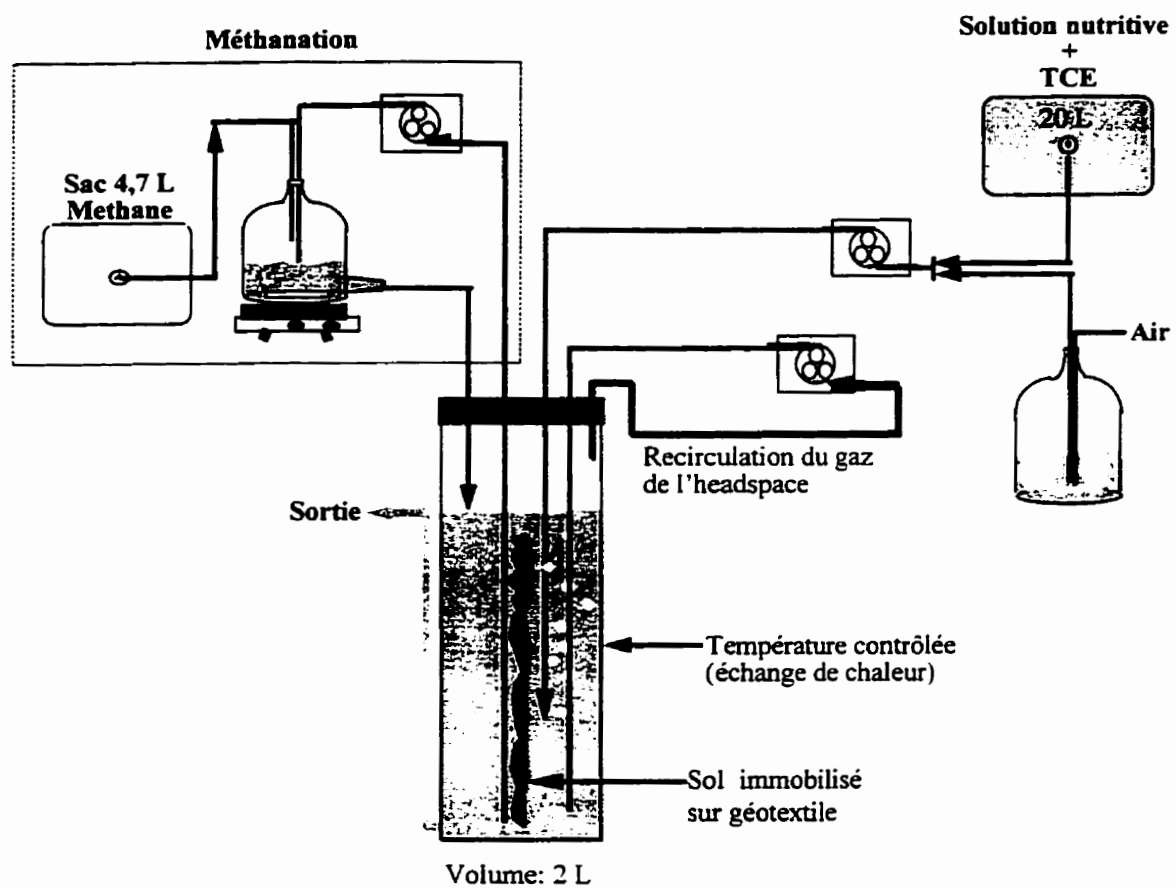


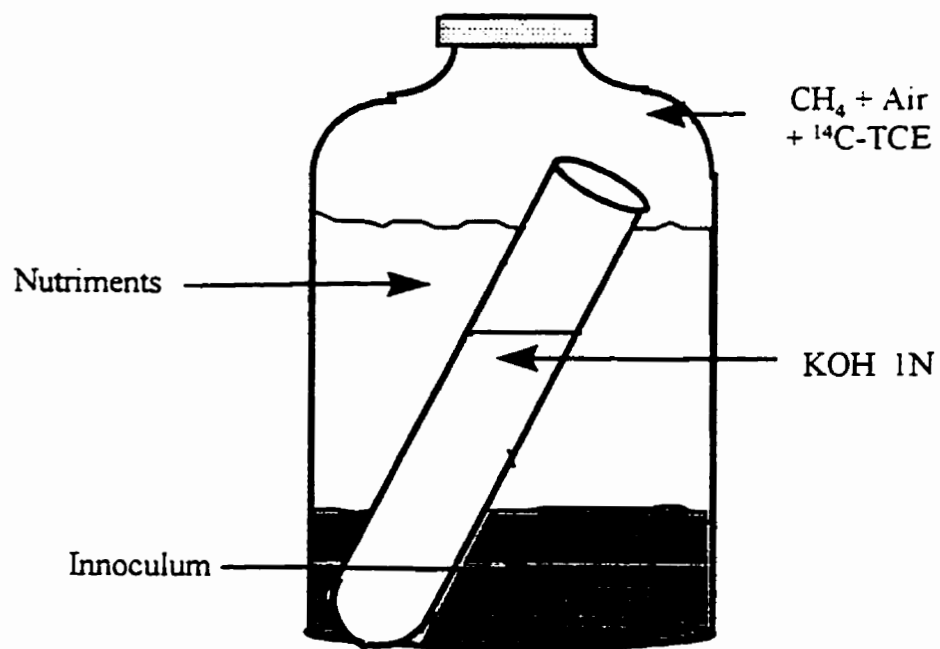
Figure 2-3 Montage pour la dégradation du TCE en mode continu

2.4 Essais de minéralisation en microcosmes

Les essais de minéralisation ont été effectués dans le but de vérifier si le consortium microbien avait la capacité de minéraliser le TCE radioactif marqué au ^{14}C .

2.4.1 Préparation des microcosmes

Les essais en microcosmes ont été réalisés dans des bouteilles sérologiques de 120 ml, contenant 60 ml de nutriments (LNSM-modifié), 20 ml d'inoculum, une trappe à CO_2 (tube en verre de 12 mm x 75 mm contenant 1 ml d'une solution alcaline, KOH 1 M) et d'un mélange gazeux CH_4 :air (1:1) (Figure 2.4). Ces bouteilles ont été scellées par une capsule d'aluminium pré-perforée (dia. = 20 mm) comprenant un septum recouvert de Teflon[®] (Supelco, Bellefonte, PA) (dia. = 20 mm). Le TCE radioactif a été ajouté dans les microcosmes, à l'aide de seringues de verre de 0,5 μL et de 1,0 μL (Hamilton, Reno, NV), dans la phase aqueuse pour obtenir des concentrations de 1 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} et 15 mg L^{-1} . Des contrôles abiotiques ont été réalisés de façon similaire en ajoutant du triazote de sodium (NaN_3 - 0,2 % m/v) (Anachemia) aux microcosmes. Les microcosmes ont été entreposés à la noirceur et à la température de la pièce (environ 20 °C).



Microcosme 120 mL

Figure 2-4 Microcosme pour les essais de minéralisation du TCE

2.4.2 Échantillonnage et mesure de la minéralisation du TCE

La minéralisation fut déterminée en mesurant l'évolution du $^{14}\text{CO}_2$ provenant du $[^{14}\text{C}]\text{TCE}$ (Bowman et al., 1993a). Le CO_2 radioactif formé était emprisonné dans la trappe de KOH. L'échantillonnage a été effectué à tous les jours, en prélevant d'abord la solution de KOH (1 ml) se trouvant dans la trappe et en rinçant la trappe avec du KOH frais (1 ml) pour ensuite remettre du KOH dans la trappe pour le prochain échantillonnage. Les 2 ml de KOH recueillis étaient ajoutés dans une fiole de 15 ml (Wallac Scintillation Products, England) remplie de 10 ml de liquide à scintillation (Optiphase Hi-Safe, Wallac Scintillation Products) et le tout était bien mélangé. Le niveau de $^{14}\text{CO}_2$ a été déterminé par un compteur à scintillation liquide (modèle LSC 1409) (Wallac Scintillation Products). Ce compteur donne l'activité, exprimée en dpm. Les valeurs obtenues ont été converties en mg de TCE minéralisé, selon l'équation suivante :

$$M_{\text{TCE}} = \frac{\text{DPM}_{\text{cumulatif}}}{\text{DPM}_{\text{initiale}}} \cdot V_{\text{TCE}} \cdot \rho_{\text{TCE}} \quad (1)$$

où M_{TCE} correspond à la quantité de TCE minéralisé, $\text{DPM}_{\text{initiale}}$ la quantité de radioactivité mise initialement à l'intérieur des bouteilles sérologiques, $\text{DPM}_{\text{cumulatif}}$ la quantité totale de radioactivité récupérée, V_{TCE} le volume de TCE injecté et ρ_{TCE} la densité du TCE.

2.5 Méthodes analytiques

2.5.1 Mesure du trichloroéthylène

L'échantillonnage a été effectué en prélevant 3 ml de milieu (voir points d'échantillonnage de la figure 2.1) à l'aide d'une seringue étanche en verre de 10 ml (modèle 1010, Hamilton). L'échantillon a été versé dans une fiole de 10 ml (Wheaton) préalablement scellé (septum en Teflon[®], dia. = 20 mm). Pour éviter une surpression à l'intérieur de la fiole lors de l'ajout du liquide d'échantillonnage, 10 ml d'air avaient préalablement été retirés. Les échantillons étaient entreposés au congélateur pour être analysés plus tard. L'extraction a été effectuée avec l'ajout de 3 ml d'hexane contenant du 1,2 - dibromoéthane (1 mg L^{-1}), comme standard interne, à l'intérieur de chaque fiole contenant les échantillons de TCE. Le 1,2-dibromoéthane a été choisi de préférence au chloroforme comme standard interne, car lors de la dégradation du TCE, une petite quantité de chloroforme peut être produite (Fliermans et al., 1988). Les échantillons ont été brassés 30 secondes à l'aide d'un vortex (Vortex Genie 2, Fisher Scientific) et ont reposé environ 5 minutes. Ensuite, 2 ml de la phase organique (phase du dessus) ont été prélevés et placés dans une fiole en verre de 2 ml (HP-5181-3375) scellé avec un septum en Teflon[®] (HP - 5181-1210) (dia. = 6 mm). Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG, modèle HP-5890) équipé avec une colonne capillaire (HP-5, (reticulé 5 % Ph Me Silicone) 25 m x 0,2 mm x 0,33 μm d'épaisseur de film) et d'un détecteur de capture d'électrons (DCE). 1 μL a été injecté à

l'aide d'un injecteur automatique (HP-7673, Hewlett Packard) dans le CPG-DCE. Le programme de température utilisé était le suivant : la température du four était augmentée de 45 °C à 150 °C à un taux de 15 °C/min, maintenue à 150 °C pour une minute, puis diminuée de 150 °C à 120 °C à un taux de 10 °C/min ; l'injecteur (split/splitless) et le détecteur (DCE) étaient maintenus respectivement à 150 °C et 250 °C (Bellar et al., 1974 et Fennel et al., 1993). L'hélium a été utilisé comme gaz porteur (138 kPa). La pression de la colonne était de 103,4 kPa. Le tout a été analysé par un intégrateur (HP-3396 A) couplé au CPG. Les temps de rétention obtenus pour le TCE et le 1,2-dibromoéthane étaient respectivement de 2,89 et 4,15 min. Les résultats ont été interprétés à l'aide d'une courbe de calibration pour le TCE et à l'aide du standard interne (voir annexe A).

Le taux de biodégradation du TCE ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) et l'efficacité (%) ont été calculés de la façon suivante :

$$\text{Taux} = \frac{[\text{TCE}]_{\text{inR}} - [\text{TCE}]_{\text{outR}}}{V_R} \cdot v \quad (2)$$

où v correspond au débit du liquide (L d^{-1})

$$\text{Efficacité} = \left(\frac{[\text{TCE}]_{\text{inR}} - [\text{TCE}]_{\text{outR}}}{[\text{TCE}]_{\text{inR}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

2.5.2 Mesure du méthane

L'échantillonnage a été effectué en prélevant 10 ml de milieu (voir points d'échantillonnages de la figure 2.1) à l'aide d'une seringue étanche en verre de 10 ml (modèle 1010, Hamilton). L'échantillon a été versé dans une fiole de 12 ml (Wheaton) préalablement scellé (septum en caoutchouc, dia. = 20 mm, Wheaton). Pour éviter une surpression à l'intérieur de la fiole, une aiguille a été insérée pour égaliser la pression lors de l'ajout du liquide échantillonné (Lanzarone et McCarty, 1990). Les échantillons étaient analysés par CPG en utilisant une colonne HP-1 (15 m x 0,53 mm x 0,15 μ m d'épaisseur de film) et d'un détecteur d'ionisation de flamme (DIF). Le programme de température utilisé était le suivant : la température du four était augmentée de 60 °C à 90 °C à un taux de 15 °C/min, et de 90 °C à 120 °C à un taux de 10 °C/min. L'injecteur et le détecteur étaient maintenus respectivement à 90 °C et 220 °C. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur (138 kPa). Avant d'être échantillonné, l'échantillon était mélangé manuellement durant 30 sec. Puis, 50 μ L de la phase gazeuse était injecté manuellement au CPG-DIF à l'aide d'une seringue étanche en verre (série 700, Hamilton) équipée d'une valve en Teflon[®] (Supelco, Bellafonte, PA). Le tout a été analysé par un intégrateur (HP-3396 A) couplé au CPG. Les résultats ont été interprétés à l'aide d'une courbe de calibration (Annexe B) réalisée par la préparation de standards de méthane. Les standards ont été préparés en injectant un volume connu de méthane à l'intérieur d'une bouteille sérologique (120 ml) (Arvin, 1991). Cette méthode donnait une mesure

de la concentration de CH_4 sous forme gazeuse qui a été transformée à l'aide de l'équation suivante pour avoir la concentration de CH_4 dans la phase aqueuse :

$$[\text{CH}_4]_L = \frac{[\text{CH}_4]_g \cdot V_g}{V_L} \quad (4)$$

où V_g = volume de gaz de l'échantillon (ml) qui correspond à l'headspace de la fiole

V_L = volume de liquide de l'échantillon (ml)

2.6 Contrôle de la qualité

Pour vérifier la qualité des mesures expérimentales effectuées, le pourcentage d'adsorption ou d'absorption soit par la seringue d'échantillonnage, le géotextile ou les seringues d'injection a été déterminé. De plus, la reproductibilité pour le même échantillon a été vérifiée.

2.6.1 Qualité des appareils

Entre chaque échantillon, la seringue d'échantillonnage était rincée à l'eau trois fois. Par la suite, un volume d'eau identique au volume d'échantillonnage a été mis dans une fiole. Une extraction à l'hexane a été effectuée pour vérifier la quantité restante de TCE

dans la seringue après le rinçage. Dans tous les cas, aucune trace de TCE n'était obtenue. Un volume d'eau identique à celui utilisé pour le méthane a été mis dans une autre fiole. La quantité de méthane gazeux dans l'headspace a été analysé par CPG-DIF. Dans tous les cas, aucune trace de méthane dissous n'a été observée.

Pour le bioréacteur, deux parties ont été vérifiées pour l'adsorption du TCE : le bouchon en caoutchouc et le géotextile. Dans le cas du bouchon, trois prélèvements ont été effectués, soient : au-dessus, au milieu et en-dessous. Ces prélèvements étaient placés à l'intérieur d'une fiole contenant de l'hexane pour l'extraction. Pour les prélèvements du dessus et du milieu du bouchon, aucune trace de TCE n'a été décelée. Par contre, pour la partie inférieure du bouchon, du TCE en quantité négligeable était à la surface due à l'agitation à l'intérieur du réacteur. Suite à une circulation d'une solution de TCE (5 mg L^{-1}) dans le réacteur, des échantillons de géotextile ont été découpés. Avec la même procédure d'extraction, il a été déterminé que le géotextile avait absorbé du TCE, à $3,45 \times 10^{-4} \text{ mg TCE cm}^{-3}$, ce qui est négligeable.

Pour les mesures effectuées avec le CPG, deux seringues étaient utilisées. La seringue pour le méthane ($50 \text{ }\mu\text{L}$), adsorbait une faible quantité de méthane (pouvant atteindre $0,1 \text{ mg L}^{-1}$), même après plusieurs rinçages en prélevant de l'air ambiant. Par contre, la seringue pour l'injecteur automatique ($1 \text{ }\mu\text{L}$) ne présentait aucun problème d'adsorption. Des échantillons en blanc (hexane avec le standard interne, sans TCE) étaient placés

entre des concentrations élevées de TCE (5 mg L^{-1}) et dans tous les cas aucune trace de TCE n'a été détectée.

2.6.2 Reproductibilité des échantillons

La reproductibilité de la part des appareils et des échantillons a été vérifiée. Dans le cas du CPG-DCE et du CPG-DIF, le même échantillon était injecté en triplicata. Pour le DIF, la précision était à l'intérieur de 10 %, alors que pour le DCE, la précision était à l'intérieur de 5 %. Pour vérifier la reproductibilité des échantillons, dépendant de la situation, jusqu'à 3 échantillons pouvaient être pris. En mode cuvée, il était pratiquement impossible de prendre plus d'un échantillon car le niveau de liquide ne devait pas descendre sous le niveau supérieur du géotextile pour éviter des dommages au biofilm et pour s'assurer que le système soit bien agité et que le liquide circule autour de la membrane. Cependant, chaque échantillon a été injecté à trois reprises dans le CPG (moins de 5 % de variation).

Les incertitudes ont été calculées sur toutes les données (Annexe C).

Chapitre 3: Résultats et discussion

3.1 Études microbiologiques

3.1.1 Milieu de culture des méthanotrophes

Plusieurs auteurs ont tenté d'optimiser les conditions de culture des bactéries méthanotrophes (Park et al., 1991; Taylor et al., 1993; Bowman et Sayler, 1994). Une étude sur deux milieux nutritifs différents a été réalisée. Le milieu à faible concentration de nitrate (LNSM, section 2.2.1.1) qui est utilisé par la plupart des chercheurs (Cornish et al., 1984; Graham et al., 1992) et le milieu LNSM-modifié ont été comparés. Dans le milieu LNSM-modifié, environ 80 % des oligo-éléments ont été enlevés car ils ne seraient pas essentiels à la croissance (Bowman et Sayler, 1994). La quantité de nitrate a été doublée (2,0 mM) pour obtenir une activité spécifique maximale de la MMOs (Bowman et Sayler, 1994). La quantité de fer sous forme ferreux (Fe^{2+}) a été doublée à $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Taylor et al., 1993), permettant ainsi d'augmenter la densité cellulaire (Park et al., 1991). Aussi, pour éviter la formation de précipité ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) à l'intérieur de la solution LNSM-modifié, du H_2SO_4 (5 ml de H_2SO_4 (1 mM) par 100 ml de solution de fer) a été ajouté au milieu (Park et al., 1991).

Afin de déterminer lequel des deux milieux de croissance est le meilleur, une souche de *M. trichosporium* OB3b a été inoculée dans une bouteille sérologique de 120 mL

contenant 10 mL de milieu LNSM stérile et saturée d'un mélange de gaz (CH_4 :air: CO_2 dans un rapport de 5:4:1). Un décompte microbien (section 2.2.4) sur milieu solide (LNSM et LNSM-modifié) a été effectué. Après 3 jours d'incubation à 30 °C des boîtes de Petri, des colonies ont été observées sur le milieu LNSM-modifié. Au moins 6 jours ont été nécessaires avant d'observer une croissance sur les boîtes de Petri avec le milieu LNSM. Pour le LNSM-modifié, le nombre de colonies par ml (151 000) était supérieur par un facteur moyen de dix par rapport à celui du LNSM (11 000) après sept jours, ce qui pourrait être dû à l'augmentation de la concentration en fer dans le milieu.

Le LNSM-modifié a été choisi pour les expériences en réacteur, car les bactéries méthanotrophes croissent plus rapidement sur ce milieu.

3.1.2 Choix du sol employé dans le réacteur à sol immobilisé

Un sol possédant un potentiel indigène méthanotrophe a été prélevé au Lac des Atocats du Mont St-Bruno (Figure 3.1). À ce lac, il y a formation de bulles à la surface de l'eau dû à un dégagement de gaz. Il y a donc la possibilité de trouver des bactéries méthanogènes (producteur de méthane) dans la partie anaérobie et de trouver à l'interface de la zone anaérobie-aérobie des bactéries méthanotrophes.

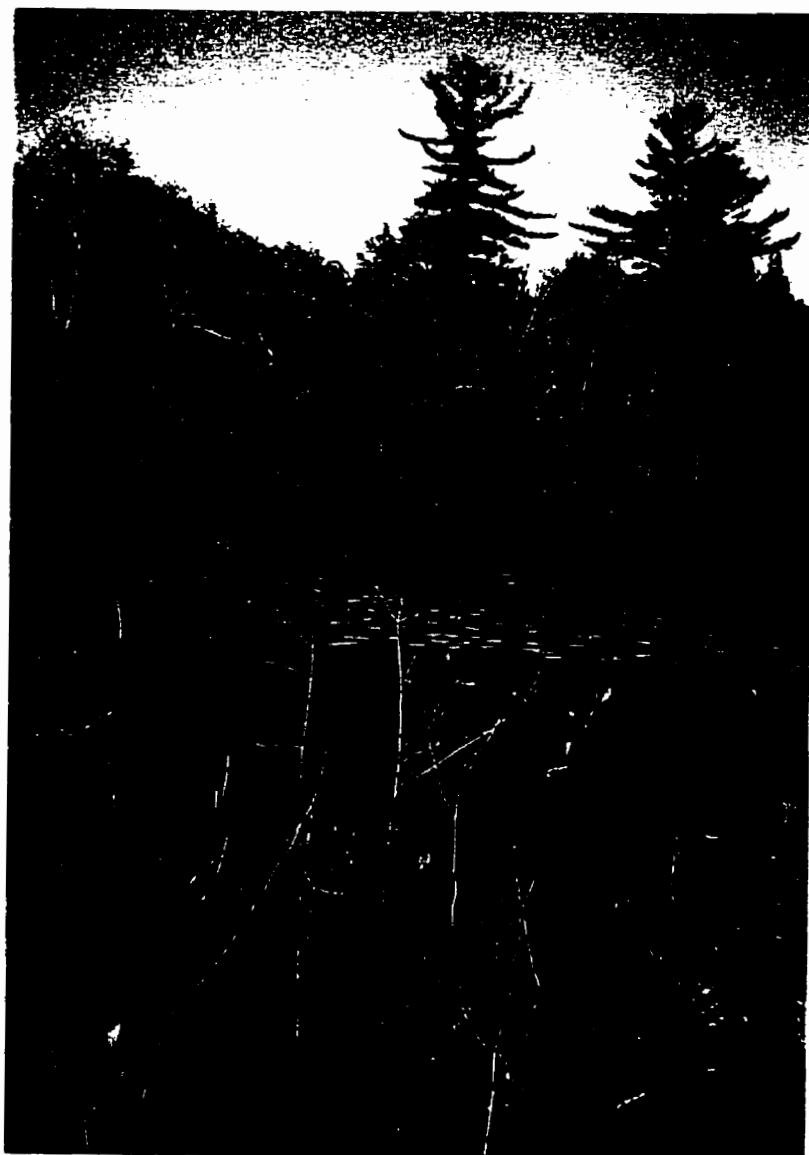


Figure 3-1 Lac des Atocats du Parc Mont St-Bruno

3.1.3 Caractérisation du consortium microbien

3.1.3.1 Identification des bactéries méthanotrophes présentes dans le sol

Pour enrichir les micro-organismes indigènes du sol, une jarre anaérobie, avec un environnement de CH_4 :air: CO_2 (5:4:1), contenant à l'intérieur un Erlenmeyer de 250 ml avec un échantillon de sol (130,2 g) a été utilisée. Elle a été mise dans un incubateur maintenu à 30 °C durant 14 jours. L'échantillon de sol contenu dans l'Erlenmeyer a été filtré (filtre de 1,5 μm). Le filtrat (5 ml) obtenu a été déposé dans une bouteille sérologique de 70 ml contenant 10 ml de LNSM. La bouteille a été scellée puis l'espace vide de la bouteille a été rempli avec un mélange gazeux de méthane:air: CO_2 (5:4:1). Les bouteilles ont été incubées à 30 °C, pour une période pouvant atteindre 21 jours. Deux types distincts de colonies ont été isolés (section 2.2.3.1) sur milieu solide LNSM-modifié (tableau 3.1).

Les bactéries obtenues sont de type méthanotrophe car elles poussent, en conditions aérobies, sur le milieu minimal (LNSM) avec le méthane comme seule source de carbone et d'énergie. Elles sont Gram-négatives. La morphologie de leur colonie et la morphologie cellulaire observée au microscope ont été comparées à la littérature (Bowman et al., 1993b) et s'apparenteraient aux espèces *Methylosinus trichosporium* et *Methylomonas methanica*.

Tableau 3.1 Identification des bactéries méthanotrophes du sol

Caractéristiques	SP1	SP2
Réaction Gram	négatif	négatif
Morphologie cellulaire	bâtonnet de forme piriforme formation de rosette	présence de bâtonnets et de coccibacilles
Morphologie des colonies sur Petri	blanchâtre, opaque, légèrement bombée et circulaire	rosâtre, opaque, légèrement bombée et circulaire
Température d'incubation	30 °C	30 °C
Source de carbone	méthane	méthane
Espèce probable	<i>Methylosinus trichosporium</i>	<i>Methylomonas methanica</i>

3.1.3.2 Identification des bactéries hétérotrophes présentes dans le sol

Une expérience pour isoler les autres types de bactéries présentes dans le sol a été effectuée. Trois types dominants de bactéries hétérotrophes ont été isolés. Deux souches ont été identifiées par Biolog comme étant, *Rhodococcus obuensis* (similitude 0,78) et *Neisseria polysaccharea* (similitude 0,82), où une similitude supérieure à 0,5 est considérée valable selon le logiciel Microlog. La troisième souche n'a pu être identifiée. Ses principales caractéristiques sont : bactérie Gram-négative de forme bâtonnet et d'apparence blanche filamenteuse sur Petri. Ces bactéries hétérotrophes se retrouvaient

généralement dans le bioréacteur dans les proportions suivantes : *Rhodococcus obuensis* (60-75 %) > *Neisseria polysaccharea* (15-30 %) > troisième souche (5-15 %).

Des décomptes hétérotrophes et méthanotrophes ont été réalisés sur la fraction liquide du bioréacteur après une période d'adaptation au méthane d'une semaine. Des concentrations en bactéries méthanotrophes et hétérotrophes de $11\,900\text{ UFC ml}^{-1}$ et $5\,200\text{ UFC ml}^{-1}$ ont été obtenues, soit un ratio de 2,29. Ces résultats ne peuvent cependant pas être interpolés pour le consortium bactérien se retrouvant sur le géotextile.

3.1.3.3 Vérification de la biodégradation du TCE par le consortium méthanotrophe

Des essais de minéralisation en microcosmes ont été effectués pour vérifier si le consortium bactérien provenant du réacteur pouvait minéraliser le TCE. Les microcosmes réalisés en triplicata étaient composés de 20 ml de culture liquide provenant du réacteur, de 60 ml d'une solution de nutriments et de 50 % (v/v) de méthane dans la phase gazeuse. Le taux de dégradation était plus élevé pour les microcosmes qui avaient une concentration initiale de TCE de 15 mg L^{-1} (Figure 3.2). Les taux initiaux moyens de dégradation du TCE augmentent en fonction de la concentration de TCE tandis que le pourcentage de minéralisation diminuait avec une augmentation de la concentration initiale de TCE (Tableau 3.2).

De plus, une croissance de la flore bactérienne dans les microcosmes a été observée (présence de floccs) après 5 jours, ce qui indique que le TCE à des concentrations aussi élevées que 15 mg L^{-1} n'inhibe pas la croissance du consortium bactérien ou d'une fraction de la population microbienne.

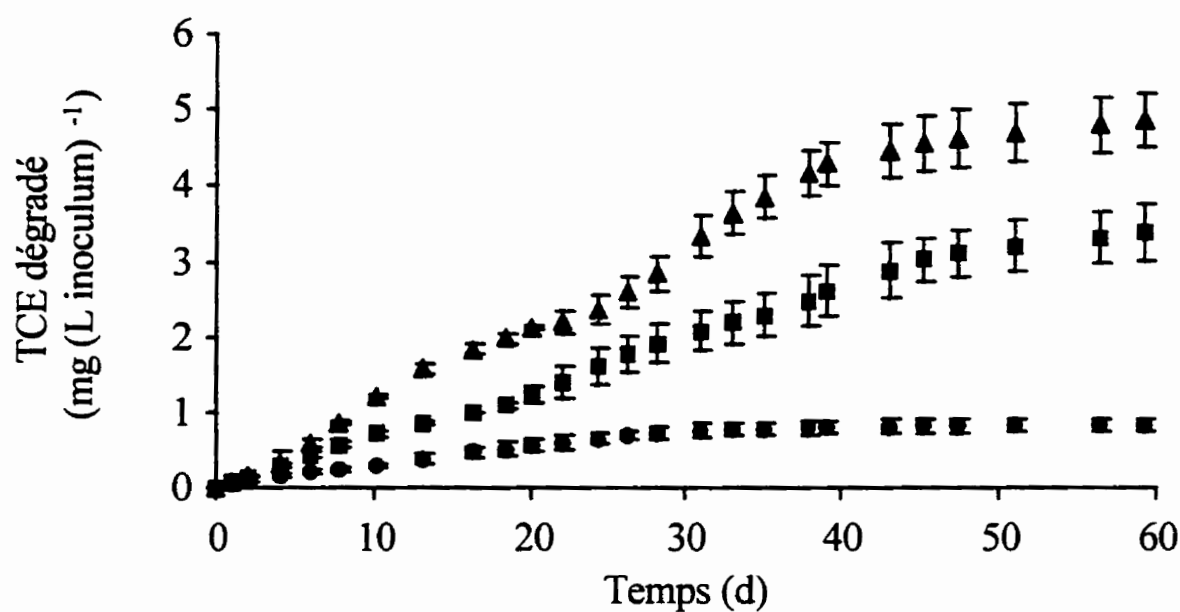


Figure 3-2 Quantité de TCE dégradé en microcosmes par un consortium bactérien en fonction du temps pour diverses concentrations initiales de TCE : (●) 1 mg L^{-1} , (■) 5 mg L^{-1} , (▲) 15 mg L^{-1}

Tableau 3.2 : Variation du pourcentage de minéralisation et du taux initial de dégradation du TCE en fonction de la concentration initiale de TCE

Concentration de TCE (mg L ⁻¹)	% minéralisation après 60 jours	Taux de dégradation initial (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
1	20,7	0,036
5	16,9	0,063
15	8,1	0,11

3.2 Étude du transfert de masse dans le système

3.2.1 Caractérisation de l'unité de méthanation

Le réacteur à sol immobilisé a déjà été caractérisé (Karamanev et al., 1996a) mais les conditions méthanotrophes pour la croissance de la flore bactérienne nécessitaient l'ajout d'une unité supplémentaire pour l'alimentation du méthane au réacteur. Le transfert de méthane dans la phase aqueuse s'effectuait dans l'unité de méthanation (Figure 2.1). Le procédé a été mis en mode continu et le débit de la pompe d'alimentation de l'unité de méthanation et la vitesse d'agitation du barreau magnétique à l'intérieur de l'unité ont été variés. Les paramètres modifiés par ces deux facteurs sont le temps de résidence (τ), la concentration de méthane et le coefficient de transfert de masse ($k_L a$). Ce dernier est calculé à l'aide de l'équation :

$$\frac{1}{\tau_m} \bullet ([CH_4]_{outM} - [CH_4]_{inM}) = k_L a ([CH_4]^* - [CH_4]_{outM}) \quad (5)$$

où $[CH_4]^*$ correspond à la concentration de saturation de méthane (24,1 mg L⁻¹ à 25 °C; Mackay et Shiu, 1981) et «a» à l'aire interfaciale. Cette équation pour le calcul du coefficient de transfert de masse a pu être utilisée en supposant qu'il y a un mélange complet dans l'unité de méthanation et en supposant que la consommation et la production de méthane par les bactéries libres sont négligeables. L'hypothèse que l'unité de méthanation est parfaitement mélangée a été vérifiée par le calcul du Peclet qui tend vers 0 (annexe D). L'hypothèse que la consommation et la production de méthane par les bactéries libres était négligeable a été vérifiée en bouteille sérologique, contenant du LNSM-modifié (60 ml) et 20 ml d'inoculum, placée sur une plaque agitatrice magnétique (Bellco Biotechnology, Vineland (New Jersey)). Par exemple, pour une concentration (0,75 mg L⁻¹) similaire à celle ajoutée dans le réacteur, le taux initial de dégradation obtenu était de 5,6x10⁻⁵ mg L⁻¹ min⁻¹. Le taux de consommation de CH₄ des bactéries libres (5,6x10⁻⁵ mg L⁻¹ min⁻¹) était donc négligeable à comparer au taux de consommation du géotextile (2,3x10⁻² mg L⁻¹ min⁻¹).

La débit d'alimentation de l'unité de méthanation contrôlait le temps de résidence du liquide dans cette unité. En augmentant le temps de résidence (Figure 3.3) et en gardant constante la vitesse d'agitation (300 tr min⁻¹), une augmentation de la concentration en méthane à la sortie de l'unité fut observée tandis que le $k_L a$ tendait à diminuer. En considérant que k_L est constant pour un système donné, une réduction du $k_L a$ serait

causée par la diminution du débit liquide (le liquide entre dans la partie supérieure du méthanateur) ce qui peut entraîner une baisse de la turbulence et donc de la surface d'échange (aire interfaciale).

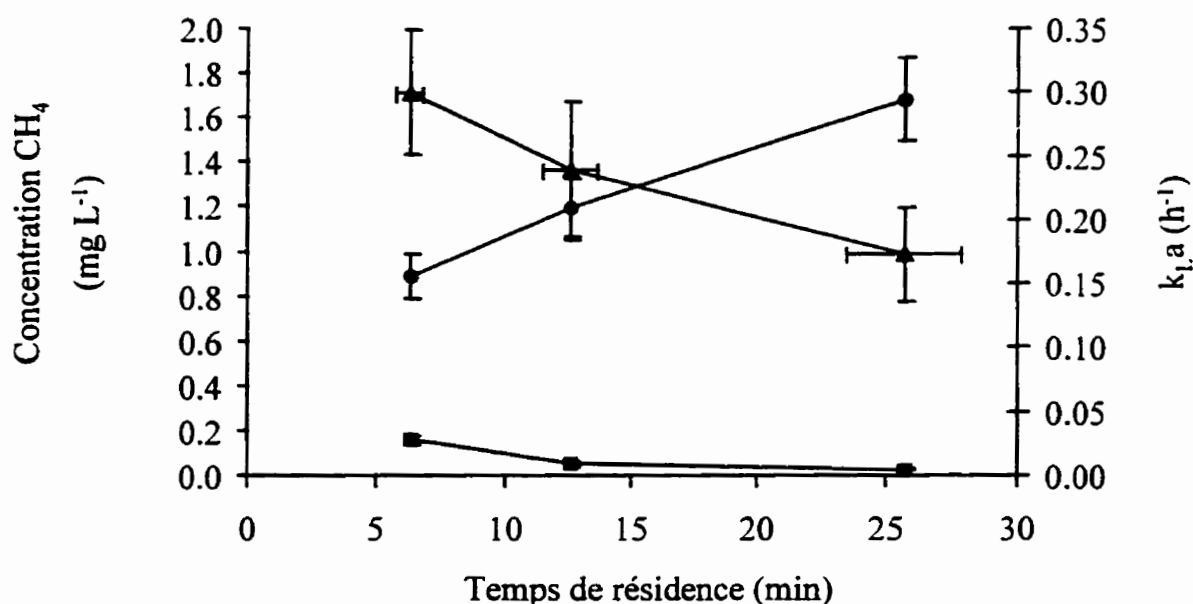


Figure 3-3 Concentration de méthane (■ in, ● out) et coefficient de transfert de masse, $k_{L,a}$ (▲), dans l'unité de méthanation en fonction du temps de résidence (vitesse d'agitation à 300 tr min⁻¹)

L'effet de la vitesse d'agitation a également été examiné. Le temps de résidence a été maintenu constant (6,3 min). Une augmentation de la concentration de méthane à la sortie de l'unité de méthanation suite à une hausse de la vitesse d'agitation a été remarquée, se traduisant par une augmentation du coefficient de transfert de masse $k_{L,a}$ (Figure 3.4). À basse vitesse d'agitation (50 tr min⁻¹), le transfert de masse est moins

élevé dû à un faible mélange. Par contre, à une vitesse supérieure, soit à 300 tr min^{-1} , il y a formation d'un vortex donc une augmentation du mélange du liquide et de l'aire interfaciale (surface d'échange) ce qui entraîne un transfert de masse supérieur.

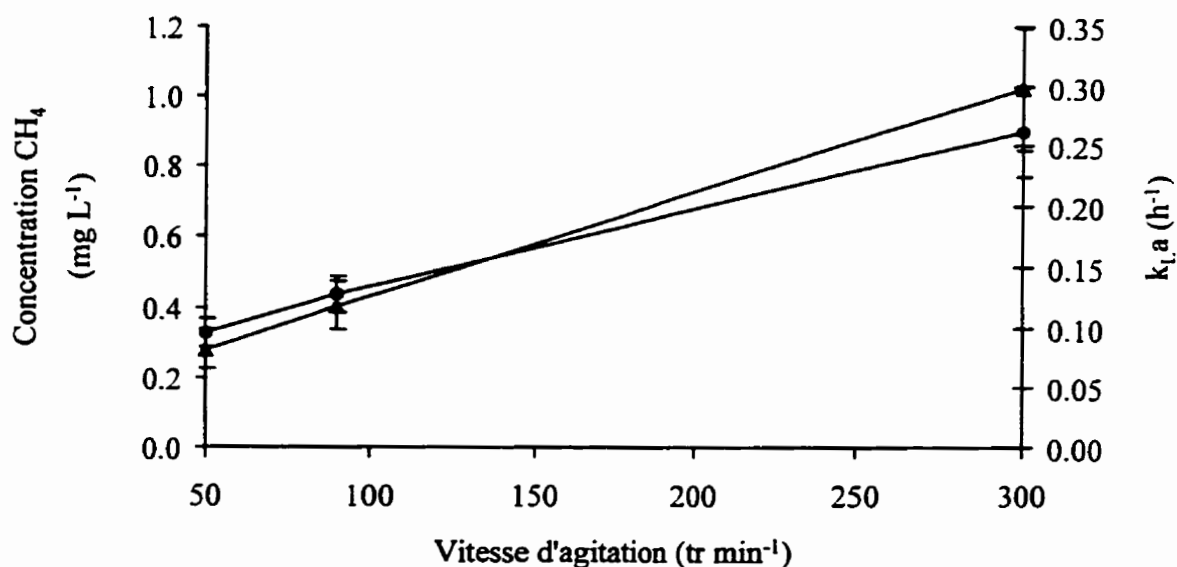


Figure 3-4 Concentration de méthane à la sortie de l'unité (●) et coefficient de transfert de masse (▲) en fonction de la vitesse d'agitation de l'unité de méthanation ($\tau = 6,3 \text{ min}$)

En résumé, on observe qu'une augmentation du temps de résidence ou de la vitesse d'agitation de l'unité de méthanation entraîne une augmentation de la concentration de méthane à la sortie de l'unité ($[\text{CH}_4]_{\text{outM}}$). L'unité de méthanation est importante car elle contrôle l'ajout de méthane qui est utilisé comme source de carbone et d'énergie par les bactéries méthanotrophes. La vitesse d'agitation et le temps de résidence de l'unité de

méthanation sont les deux paramètres qui influencent la quantité de méthane dissout. Lors de l'adaptation des bactéries sur le géotextile, il faut un taux de fourniture élevé de méthane dans le réacteur pour avoir une croissance maximale des bactéries (vitesse d'agitation élevée et un temps de résidence court dans l'unité de méthanation). Lors de la biodégradation du TCE, puisque le CH_4 et le TCE sont en compétition pour les sites actifs de la MMOs, un faible taux de fourniture de CH_4 est nécessaire. Une vitesse d'agitation plus faible et un temps de résidence plus long dans l'unité de méthanation seront favorisés. Cependant, la vitesse d'agitation ne doit pas être trop faible pour éviter la formation d'un biofilm dans l'unité de méthanation, ni trop élevée car à une vitesse d'agitation supérieure à 300 tr min^{-1} il y a formation de bulles à l'intérieur de l'unité de méthanation qui peuvent s'échapper à l'extérieur du système et le méthane ne serait plus ajouté sous forme dissoute. Par conséquent, la vitesse d'agitation de l'unité de méthanation a été fixée à 300 tr min^{-1} .

3.2.2 Bilan de masse sur le TCE dans un réacteur abiotique

Dans les études précédentes (Karamanev et al., 1996a et 1997), les bioréacteurs à sol immobilisé étaient utilisés pour la dégradation des contaminants non volatils. Dans le cas de cette étude, le TCE est très volatil. Les pertes dues à la volatilisation peuvent donc être importantes à cause de l'aération. L'oxygène dans le réacteur peut être ajouté

de deux façons, soit sous forme gazeuse (système ouvert pour le gaz) ou soit sous forme dissoute (système fermé pour le gaz).

3.2.2.1 Système avec ajout d'oxygène sous forme gazeuse

Dans un système ouvert avec aération, une certaine volatilisation de TCE peut se produire. Le degré de volatilisation du TCE a été étudié dans le système en continu avec ajout d'oxygène sous forme gazeuse. L'expérience a été effectuée sur une période de 80 heures (Figure 3.5) avec le montage décrit à la figure 2.1 s'est déroulée en absence de géotextile.

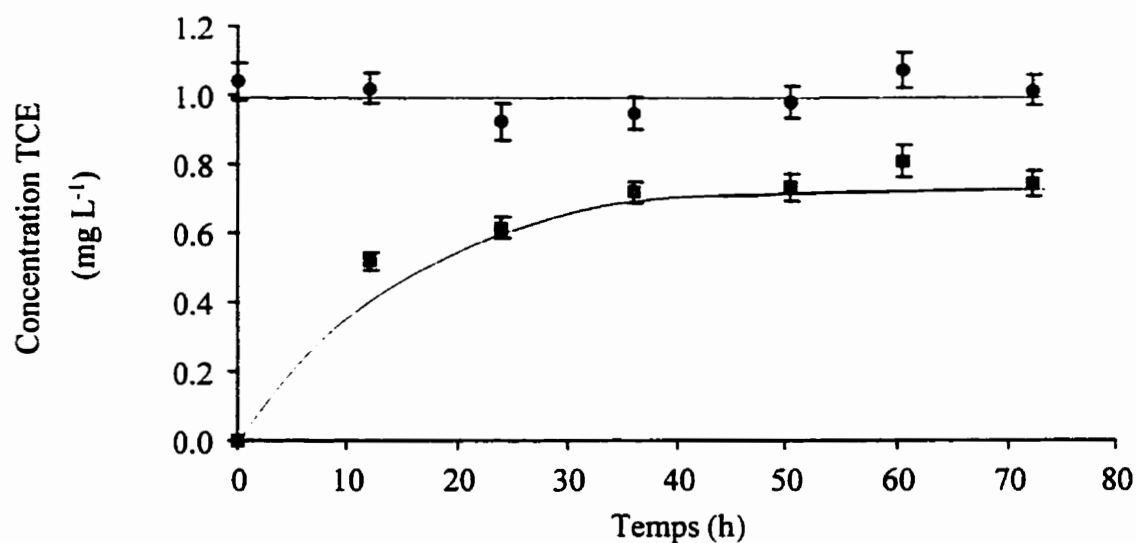


Figure 3-5 Dynamique du système en condition abiotique pour le TCE (1 mg L^{-1}) en système ouvert avec un taux d'aération de $0,5 \text{ L air min}^{-1}$ (●)[TCE] à l'entrée, (■)[TCE] à la sortie, τ : 6 heures, température : 30°C

Une différence moyenne de 25 % entre la concentration de TCE à l'entrée et à la sortie du réacteur a été observée (Figure 3.5). Ce pourcentage est non négligeable en système ouvert. La volatilisation du TCE doit donc être prise en compte.

3.2.2.2 Système avec ajout d'oxygène sous forme dissoute

Due à la perte non négligeable de TCE en système ouvert, la possibilité d'ajouter l'oxygène sous forme dissoute a été étudiée. Pour ce faire, l'air fut barboté dans une jarre remplie d'eau avec agitation et l'eau aérée est ajoutée en même temps que l'eau contaminée à l'intérieur du bio-système. Pour créer l'agitation et la recirculation du liquide à l'intérieur du réacteur, le gaz de l'headspace est recirculé à l'aide d'une pompe au même débit volumétrique qu'auparavant.

Dans le but d'évaluer si l'ajout d'oxygène sous forme dissoute dans un système clos pour les gaz diminuait la perte de TCE par volatilisation, une étude s'est déroulée sur une période de 10 jours (Figure 3.6), avec quatre étapes distinctes : l'ajout de TCE dans le réacteur rempli d'eau sans agitation, ajout de TCE avec recirculation de l'headspace, installation du géotextile avec arrêt de l'agitation et dernièrement mise en marche de la recirculation de l'headspace en présence du géotextile. En général, le système avec ajout d'oxygène sous forme dissoute empêche la volatilisation du TCE (une variation inférieure à 4 % a été observée, ce qui est à l'intérieur de l'incertitude de l'appareil (5 %

au détecteur DCE). Le seul moment où il y a eu une diminution plus importante de la concentration de TCE à la sortie est lors de l'installation du géotextile qui a entraîné l'ouverture du système et le rajout de liquide (sans TCE), mais le tout s'est rétabli par la suite.

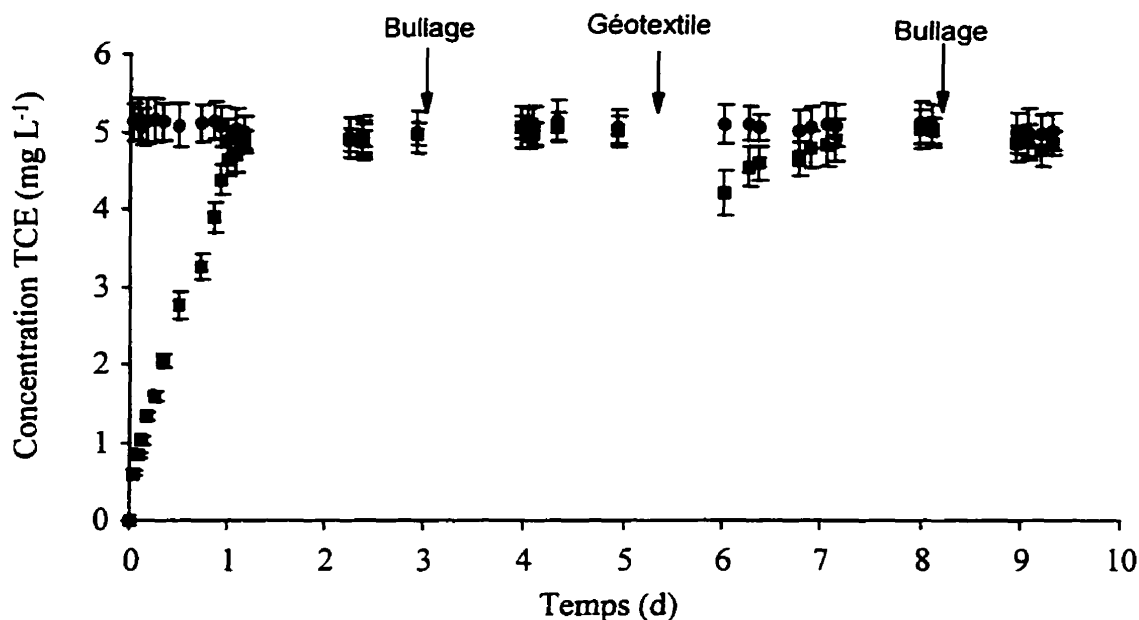


Figure 3-6 Dynamique du système en condition abiotique pour le TCE (5 mg L⁻¹) en système fermé (●) [TCE] à l'entrée, (■) [TCE] à la sortie, température : 30 °C, débit de recirculation du headspace de 0,5 L min⁻¹. (↓ bullage, indique en période d'agitation) (↓ géotextile, indique l'ajout du géotextile avec au même moment l'arrêt de l'agitation)

À l'échelle laboratoire, le système avec ajout d'oxygène dissout (système fermé) est préférable pour évaluer les possibilités du système et surtout pour être bien sûr qu'il y a dégradation du TCE et non volatilisation. Donc, pour effectuer les expériences en

continu avec le TCE, ce système sera utilisé; cependant, lors de la période d'acclimatation du consortium microbien, le système ouvert sera utilisé.

3.2.3 Immobilisation du sol

L'immobilisation du sol crée un écosystème favorable au développement de la flore bactérienne et favorise la formation d'une biomasse sur le géotextile. La dynamique d'immobilisation du sol sur le géotextile a été mesurée. Le temps d'immobilisation des particules de sol correspond au temps nécessaire pour que la densité optique (DO) de la fraction liquide du réacteur à 660 nm devienne égale à la DO des nutriments. Pour les trois expériences, les courbes d'immobilisation du sol correspondent à des exponentielles inverses (Figure 3.7).

Pour l'expérience A, 3,63 g de sol ($d < 0,150$ mm, Annexe E) a été utilisé. Pour les expériences B et C, 3,55 g du même sol a été utilisé. Le temps nécessaire pour que le système revienne à son état initial ($DO = DO$ des nutriments) est de 45,7 heures pour les trois expériences (Figure 3.7).

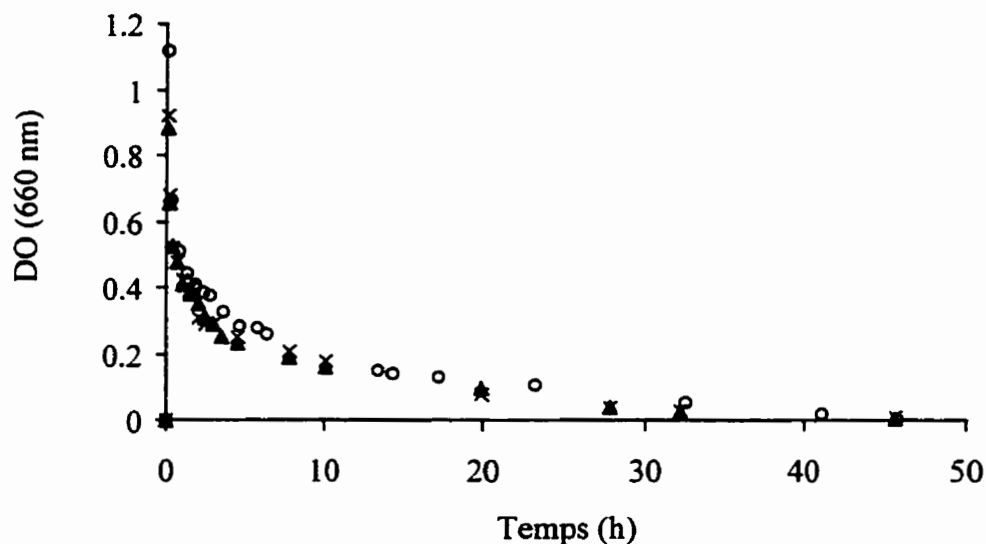


Figure 3-7 Suivi de la densité optique (DO) à 660 nm pour l'immobilisation du sol sur le géotextile pour diverses expériences (O) expérience A, (▲) expérience B, (×) expérience C

L'immobilisation du sol sur le géotextile peut être caractérisée en utilisant l'équation suivante (Karamanev et al., 1997) :

$$DO = DO_0 \frac{(1-\beta)}{e^{\lambda_0(1-\beta)t} - \beta} \quad (6)$$

Il est possible de déterminer les deux constantes β et λ_0 par régression non-linéaire à partir des données expérimentales. DO_0 correspond à la densité optique initiale. Des valeurs de 1,10 et $0,02 \text{ min}^{-1}$ ont été obtenues respectivement pour β et λ_0 ($r^2 = 0,97$).

3.3 Biodégradation du TCE et du CH₄ dans un réacteur à sol immobilisé en mode cuvée et en continu

3.3.1 Cinétique de consommation du méthane

Des essais en cuvée (Figure 2.2) ont été réalisés pour analyser la cinétique de dégradation du méthane dans le réacteur. La recirculation du gaz de l'headspace du réacteur permet une bonne distribution du TCE et du substrat (CH₄) et permet aussi l'agitation dans le réacteur. Pour faciliter la prise d'échantillon, une pompe permettait de faire circuler du liquide en circuit fermé (Figure 2.2).

Pour déterminer la cinétique de consommation du méthane, plusieurs essais en bioréacteur à sol immobilisé en mode cuvée ont été réalisés (Figure 3.8). Lors de ces essais, des échantillons de milieu liquide ont été prélevés pour suivre la concentration de méthane et d'oxygène dans le réacteur en fonction du temps. L'utilisation du méthane suivait le modèle de Monod (Figure 3.8).

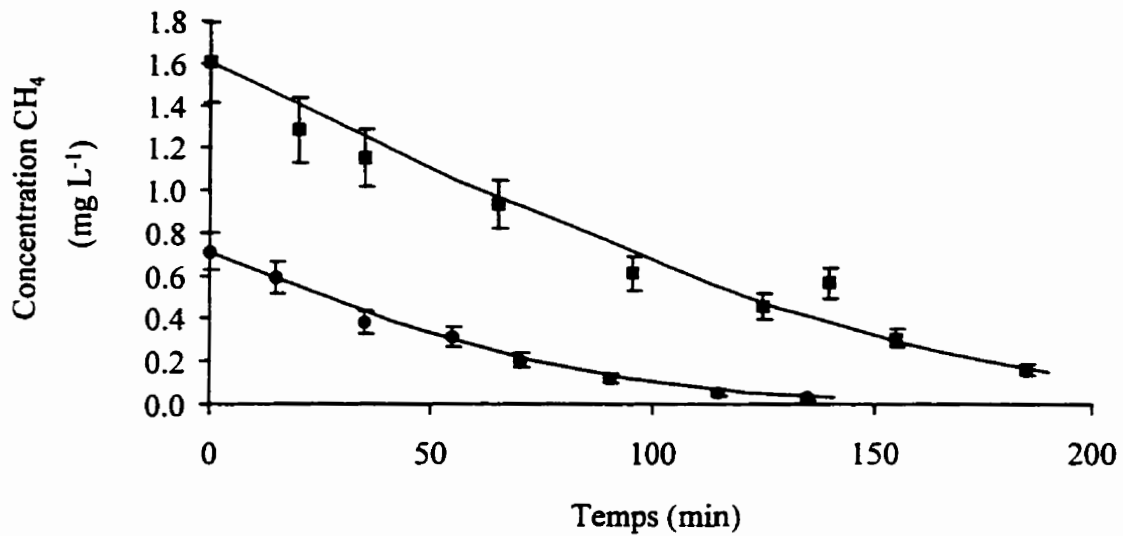


Figure 3-8 Essais de consommation du méthane par les bactéries d'un réacteur à sol immobilisé en mode cuvée à une température de 30 °C (●) essai 1, (■), essai 2, (-) modèle de Monod

Le K_s (concentration qui correspond à la moitié du taux maximal) et le K (taux de consommation maximal) ont été déterminé à partir des équations suivantes :

Pour un réacteur en cuvée :

$$-r_s = \frac{dS}{dt} \quad (7)$$

Selon l'équation de Monod :

$$-r_s = \frac{K S}{K_s + S} \quad (8)$$

$$\frac{(K_s + S)}{S} dS = K dt \quad (9)$$

$$K_s \int_{S_0}^S \frac{1}{S} dS + \int_{S_0}^S dS = \int_{t_0}^t K dt \quad (10)$$

$$K_s \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) + (S - S_0) = Kt \quad (11)$$

K_s et K ont été déterminés par une régression non linéaire à partir de l'équation (11). Les valeurs de K et K_s étaient respectivement de 0,013 mg CH₄ L⁻¹ min⁻¹ et 0,35 mg CH₄ L⁻¹ pour le premier essai et de 0,014 mg CH₄ L⁻¹ min⁻¹ et 0,51 mg CH₄ L⁻¹ pour le deuxième essai avec un coefficient de corrélation moyen de 0,988. Broholm et al. (1992) avaient rapportés des valeurs de K_s variant entre 0,24 et 0,42 mg CH₄ L⁻¹ pour des cultures mixtes de méthanotrophes.

À partir des mesures d'oxygène dissout, le rapport molaire de l'oxygène consommé sur le méthane pour le consortium microbien du réacteur à sol immobilisé est de 1,6 :1. Ce rapport se compare à celui de l'étude de Strand et al., (1990) qui ont obtenu un ratio de 1,66. Ces ratios sont inférieurs à ceux obtenus par l'équation stoechiométrique de l'oxydation du CH₄ par l'O₂ qui est de 2:1.

3.3.2 Biodégradation du TCE en absence de méthane

Dans le but de vérifier la capacité du consortium bactérien de dégrader le TCE en absence de méthane, des expériences en mode cuvée semblables à celles réalisées pour le méthane ont été effectuées. Il a été démontré que le consortium avait la capacité de dégrader le TCE ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) durant une période d'au moins 12 h avec un taux linéaire de $0,016 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ après environ trente minutes (Figure 3.9). Cependant, en répétant l'expérience sans ajout subséquent de méthane, avec une concentration initiale de TCE de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, le taux de dégradation n'était plus que de $0,0172 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Les bactéries obtenaient donc l'énergie nécessaire pour la biodégradation d'une autre source que le méthane, probablement le PHB (Henry et Grbic-Galic, 1991). Les bactéries pourraient ainsi utiliser leur réserve de PHB jusqu'à épuisement pour activer la MMOs qui dégrade le TCE. Un troisième essai avec une concentration initiale de TCE de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ a démontré une dégradation presque nulle. Après 37 heures, le consortium ne dégradait plus le TCE, ce qui indique que la source d'énergie était épuisée ou que l'enzyme MMOs devait être inactive. Cette enzyme nécessite donc la présence obligatoire du méthane pour être active pour une longue période car le méthane est une source d'énergie et qu'il stimule la synthèse de la MMO (Henry et Grbic-Galic, 1991).

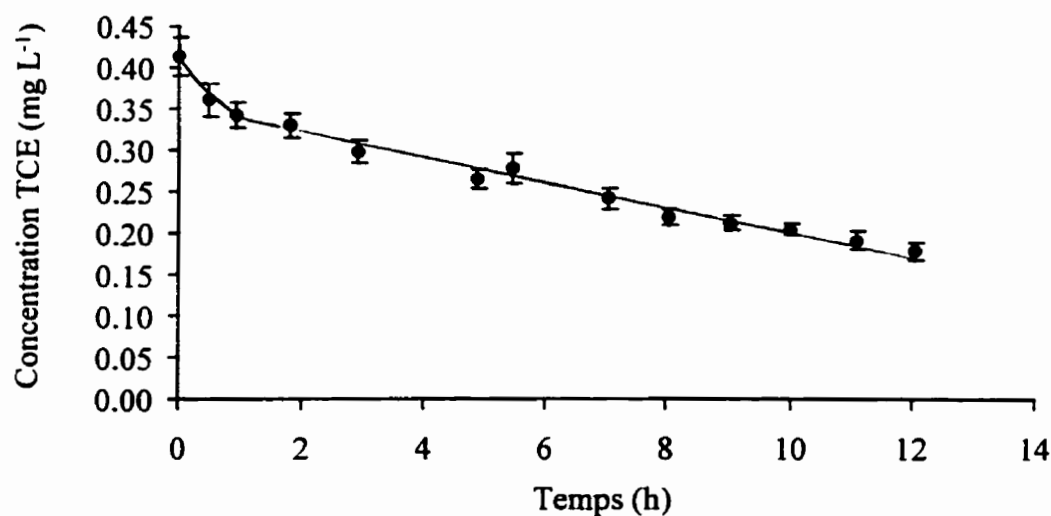


Figure 3-9 Essai pour la dégradation du TCE dans un réacteur à sol immobilisé en mode cuvée sans CH₄ à une température de 30 °C

3.3.3 Essais en mode continu pour la dégradation du TCE

Pour avoir un taux de dégradation de TCE élevé, il faut avoir une biomasse importante de bactéries méthanotrophes actives. Pour favoriser la croissance bactérienne sur le géotextile, ce qui est privilégiée par une fourniture élevée en méthane, il n'y a aucun ajout de TCE. Quand le taux de consommation en méthane est maximal, le TCE peut être ajouté. Deux essais en continu (Figure 3.10) d'une période d'environ 36 jours ont été réalisés pour étudier l'influence du taux de fourniture en méthane, la cinétique de dégradation du TCE et l'influence du temps de résidence dans le réacteur.

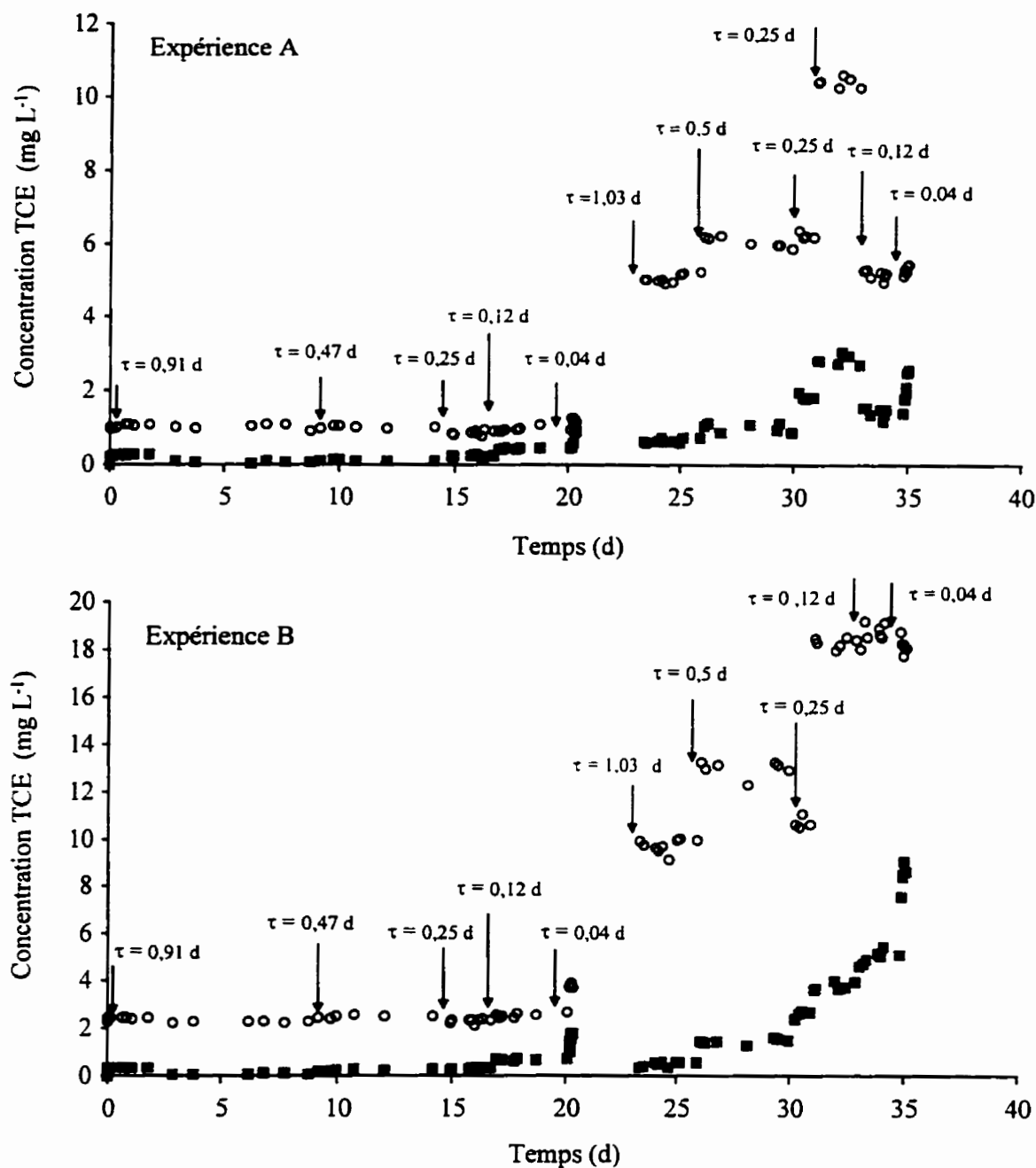


Figure 3-10 Dégénération du TCE dans un réacteur à sol immobilisé en mode continu à 30 °C : (O) [TCE] alimentée, (■) [TCE] dans le réacteur. Les incertitudes ne sont pas incluses dans la figure pour faciliter la compréhension.

Pour les expériences A et B, le taux de fourniture en méthane était diminué après trois jours tout en maintenant un temps de résidence constant de 0,91 d à l'intérieur du réacteur. Ensuite, le taux de fourniture en méthane était maintenu constant puis le temps de résidence et la concentration de TCE alimentée au réacteur étaient variés. Le temps de résidence variait entre 0,04 d et 1,03 d. La concentration de TCE alimentée variait entre 1 mg L⁻¹ et 18 mg L⁻¹.

3.3.3.1 Influence du taux de fourniture du CH₄

La première partie des essais en continu consistait à vérifier l'influence du taux de fourniture en méthane sur la dégradation du TCE. Le taux de fourniture en méthane au réacteur est contrôlé principalement à l'aide de la pompe d'alimentation de l'unité de méthanation (Figure 2.3). Pour obtenir un taux de fourniture élevé en méthane, il faut favoriser un débit d'alimentation rapide, ce qui implique un temps de résidence court. Le taux de fourniture est calculé à partir de cette équation :

$$([\text{CH}_4]_{\text{outM}} - [\text{CH}_4]_{\text{inM}})/\tau_M \quad (12)$$

Il existe un lien direct entre le taux de fourniture de CH₄ et l'efficacité du réacteur pour la dégradation du TCE (tableau 3.3) pour un temps de résidence constant dans le réacteur (0,91 d). Une augmentation moyenne de 14 % de l'efficacité du bioréacteur pour la dégradation du TCE a été observée quand le taux de fourniture en méthane était diminué

de moitié. C'est pourquoi, les essais suivants ont été réalisés en essayant de maintenir un taux de fourniture en méthane faible et en variant seulement le temps de résidence du bioréacteur et la concentration d'alimentation de TCE.

Tableau 3.3 Résultats démontrant l'influence du taux de fourniture du méthane sur l'efficacité du bioréacteur pour la dégradation du TCE.

Expérience	$[\text{CH}_4]_{\text{inR}}$ (mg L ⁻¹)	$[\text{CH}_4]_{\text{outR}}$ (mg L ⁻¹)	Taux de fourniture CH ₄ (mg L ⁻¹ min ⁻¹)	$[\text{TCE}]_{\text{in}}$ (mg L ⁻¹)	$[\text{TCE}]_{\text{out}}$ (mg L ⁻¹)	Efficacité (%)
A	0,449	0,054	0,063	1,05	0,26	75,5
	0,655	0,030	0,024	1,03	0,08	91,9
B	0,434	0,053	0,060	2,42	0,33	86,4
	0,747	0,035	0,028	2,26	0,06	97,3

3.3.3.2 Influence de la concentration de TCE dans l'alimentation et du temps de résidence dans le réacteur

Le taux de dégradation du trichloroéthylène variait de façon linéaire en fonction de la concentration d'alimentation de TCE pour un temps de résidence donné (Figures 3.11 et 3.12). Plus le temps de résidence était court, plus les taux de dégradation obtenus étaient élevés pour une même concentration d'alimentation. Le taux de dégradation maximal obtenu était de 230 mg L⁻¹ d⁻¹ pour une concentration d'alimentation de 18 mg L⁻¹ et un

temps de résidence de 0,04 d (Figure 3.12). Pour les figures 3.11 et 3.12, les points représentés dans le graphique étaient en régime permanent. Ce régime a été atteint après que le liquide ait circulé pendant une période équivalente à trois fois le temps de résidence dans le réacteur.

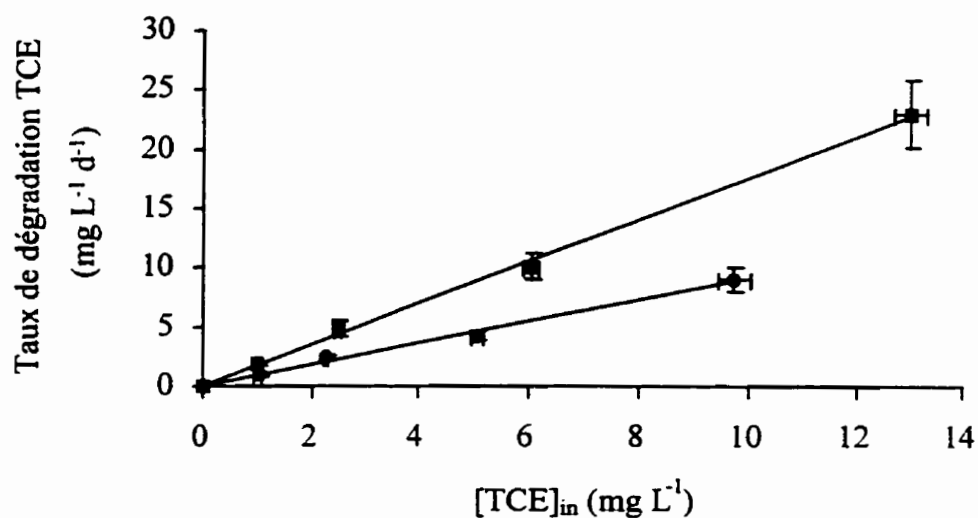


Figure 3-11 Taux de dégradation du TCE par rapport à la concentration de TCE alimentée pour des temps de résidence de 1 d (●) et de 0,5 d (■)

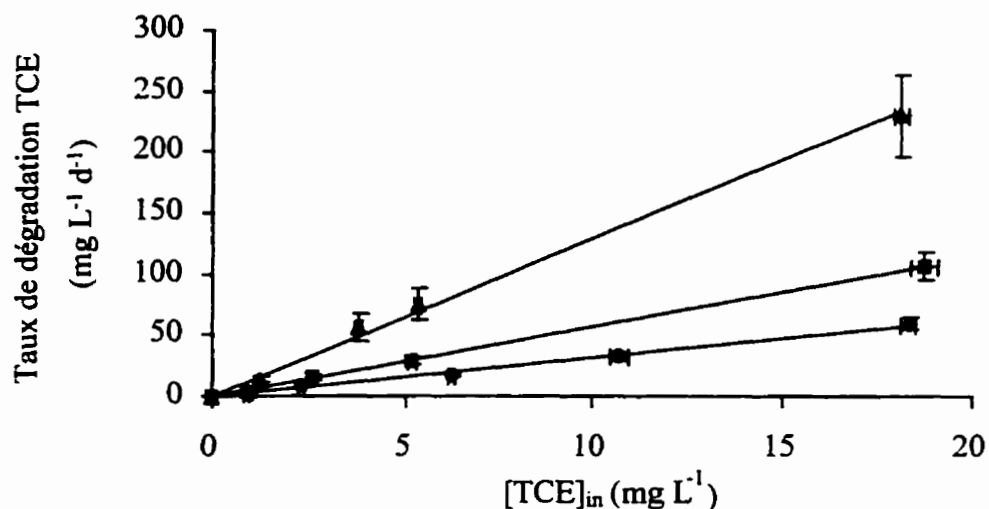


Figure 3-12 Taux de dégradation du TCE par rapport à la concentration de TCE alimentée pour des temps de résidence de 0,25 d (●), 0,12 d (■) et 0,04 d (▲)

Si on regarde le taux de dégradation du TCE par rapport au temps de résidence en gardant constant la concentration de TCE alimentée (Figure 3.13), on observe, selon les deux concentrations d'alimentation illustrées (même tendance pour les autres concentrations), que le taux de dégradation augmente de façon exponentielle lorsque le temps de résidence diminue.

Le taux de dégradation augmentait avec une diminution du temps de résidence tandis que l'efficacité (conversion) diminuait (Figure 3.14). L'efficacité maximale obtenue lors des expériences fut de 97,3 % pour un temps de résidence de 0,91 d.

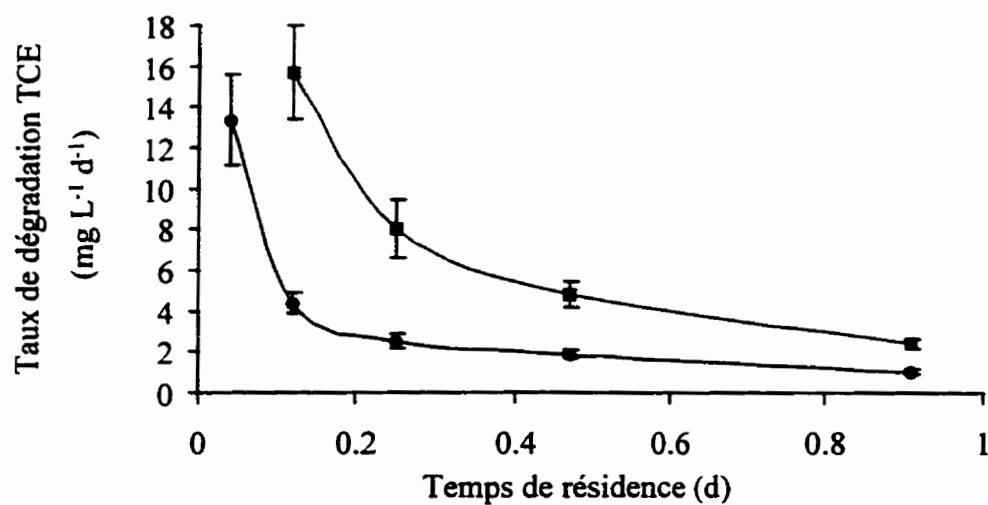


Figure 3-13 Taux de dégradation du TCE en fonction du temps de résidence pour des concentrations de TCE alimentées de 1,0 mg L⁻¹ (●) et de 2,4 mg L⁻¹ (■)

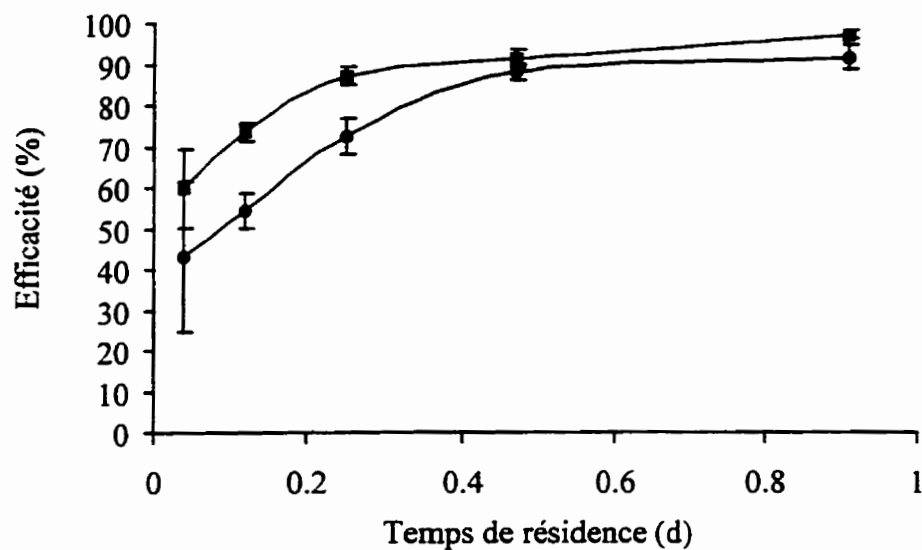


Figure 3-14 Efficacité d'enlèvement du TCE en fonction du temps de résidence pour des concentrations de TCE alimentées de 1,0 mg L⁻¹ (●) et de 2,4 mg L⁻¹ (■)

3.3.3.3 Cinétique de dégradation du TCE

La cinétique de la réaction par rapport au TCE a été effectuée en mode continu. Les essais en continu ont été effectués pour des concentrations inférieures à 18 mg L^{-1} et le taux de dégradation maximal n'a pas été atteint, ce qui laisse supposer que l'on se trouvait dans la partie linéaire du modèle de Monod. Le taux de dégradation du TCE était linéaire en fonction des concentrations de TCE à la sortie du réacteur (Figure 3.15).

Dans le modèle de l'équation de Monod, on a :

$$-r_s = \frac{KS}{K_s + S} \quad (13)$$

Si on suppose $K_s \gg S$, on peut écrire que

$$-r = K_1 S \quad (14)$$

où K_1 qui est une constante cinétique de premier ordre correspond à K/K_s où K correspond au taux de consommation maximal de TCE ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) et K_s à la concentration correspondant à la moitié du taux maximal (mg L^{-1}). La constante K_1 a été déterminée en calculant la pente de la droite de la Figure 3.15. Le rapport K/K_s était égal à $21,8 \text{ d}^{-1}$.

Pour vérifier que le K_s était beaucoup supérieur à S , une courbe de la concentration de TCE à la sortie du réacteur en fonction du temps de résidence a été tracée (Figure 3.16).

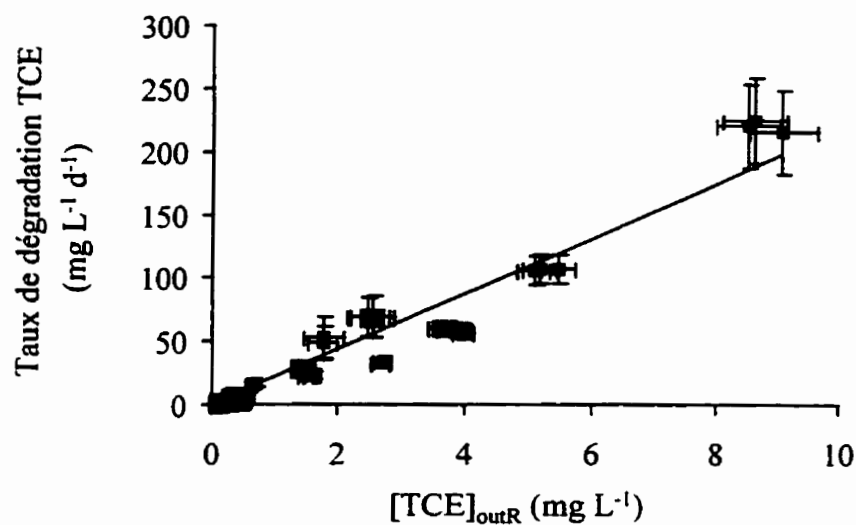


Figure 3-15 : Taux de dégradation du TCE en fonction des concentrations à la sortie du réacteur

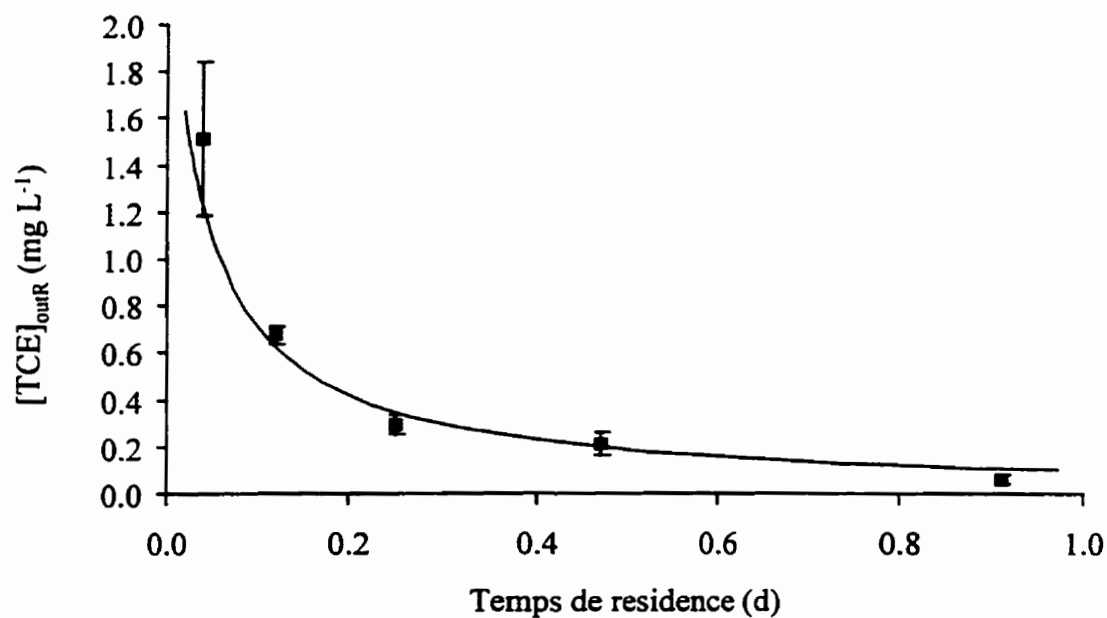


Figure 3-16 Concentration de TCE à la sortie du réacteur en fonction du temps de résidence pour une concentration de TCE alimentée de 2,4 mg L⁻¹ (■)

En assumant que le réacteur était bien mélangé, les constantes cinétiques K et K_s du modèle de Monod ont pu être déterminées.

Pour un réacteur bien mélangé,

$$-r_s = \frac{(S_0 - S)}{\tau} \quad (15)$$

Selon l'équation de Monod,

$$-r_s = \frac{KS}{K_s + S} \quad (16)$$

$$\frac{(S_0 - S)}{\tau} = \frac{KS}{K_s + S} \quad (17)$$

$$\tau = \frac{(S_0 - S) \cdot (K_s + S)}{KS} \quad (18)$$

Les valeurs de K_s et K ont été déterminées par régression non linéaire. Des valeurs de 144 mg TCE L⁻¹ et de 3415 mg TCE L⁻¹ d⁻¹ ont été obtenues respectivement pour K_s et K avec un coefficient de corrélation de 0,98. Vu que le K_s obtenu à partir de l'équation de Monod est très supérieur à la concentration finale de TCE, la cinétique de dégradation par rapport au TCE suit une cinétique d'ordre 1. Le rapport de K/K_s est égal à 23,7 d⁻¹. Ce rapport est presque identique à celui trouvé pour la constante cinétique K_1 .

3.3.3.4 Comparaison avec la littérature

Les résultats obtenus par différents chercheurs travaillant avec des consortiums bactériens mixtes en réacteur continu ont été comparés avec les résultats de ces travaux (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 Comparaison des résultats obtenus par d'autres auteurs utilisant un consortium de méthanotrophes pour la dégradation du TCE en bioréacteur

Travaux	[TCE] _{in} (mg L ⁻¹)	[TCE] _{out} (mg L ⁻¹)	Temps de résidence (d)	Taux maximum dégradation (mg TCE L ⁻¹ d ⁻¹)	Efficacité (%)
Lanzaronne et al. 1990	0,025	0,0185	0,02	0,33	26
Arvin, 1991	1,2	0,924	0,2	1,38	23
Fennel et al. 1993	11,3	8,6	0,11	24,5	23,9
Aziz et al. 1995 ^a	0,097	0,075	0,0065	3,38	22,7
Pierre et al. 1997	2,26	0,061	0,91	2,42	97,3
Pierre et al. 1997	18,12	8,46	0,042	230	53,3

^a Bioréacteur avec une souche pure de méthanotrophe : PP358 de *M. trichosporium* OB3b

Si on se compare avec l'étude de Arvin (1991) et celle de Lanzaronne et al., (1990) pour une concentration de TCE faible à la sortie, le taux de dégradation obtenu avec le sol immobilisé est respectivement supérieur d'un facteur de 1,75 et 7,3 et l'efficacité est plus grande de 323 % et de 274 %. Pour une concentration de TCE à la sortie plus élevée (Fennel et al., 1993), le taux de dégradation et l'efficacité obtenus avec le réacteur à sol immobilisé sont supérieurs d'un facteur de 9,4 et de 307 %. L'étude de Aziz et al. (1995) a rapporté un taux de dégradation plus élevé pour une concentration de TCE faible à la sortie mais l'efficacité (22,7 %) est très faible comparativement au réacteur à

sol immobilisé (97,3 %). De plus, le système utilisé par Aziz, à grande échelle, serait moins applicable et entraînerait des coûts supplémentaires pour le maintien de la stérilité. En général, les taux de dégradation et les efficacités obtenus à partir du réacteur à sol immobilisé sont très supérieurs à ceux obtenus par ces auteurs.

Chapitre 4: Conclusion et recommandations

4.1 Conclusion

Le principal objectif de ce projet de recherche consistait à développer un procédé pour la dégradation du trichloroéthylène employant un sol immobilisé contenant un consortium méthanotrophe. Des études antérieures avaient démontré que le concept du bioréacteur à sol immobilisé était performant pour la minéralisation de contaminants aqueux (ex : PCP). Les résultats obtenus ont pu démontrer que le concept du réacteur à sol immobilisé en conditions méthanotrophes pour la minéralisation du trichloroéthylène était fonctionnel et très prometteur. À partir des résultats présentés, plusieurs conclusions ont pu être tirées :

1) Les bactéries méthanotrophes sont présentes en plus grand nombre dans le sol utilisé dans le réacteur à sol immobilisé que les bactéries hétérotrophes. Les deux souches dominantes sont probablement : *Methylomonas methanica* et *Methylosinus trichosporium*.

2) L'étude en microcosmes a montré que :

- Le consortium méthanotrophe peut minéraliser le TCE.
- En phase aqueuse, le TCE, jusqu'à une concentration de 15 mg L^{-1} , n'inhibe pas significativement la croissance microbienne.
- Le taux de dégradation augmente avec une augmentation de la concentration de TCE.

3) L'étude du transfert de masse a permis de :

- Caractériser l'unité de méthanation : l'ajout de méthane est influencé par le débit d'alimentation de l'unité de méthanation et l'agitation. Le coefficient de transfert de masse $k_L a$ est influencé par l'agitation de cette même unité.
- Caractériser le bilan de masse du TCE dans un réacteur abiotique : avec un système ouvert pour l'ajout de l'oxygène sous forme gazeuse, une perte atteignant 25 % de TCE par volatilisation a été observée; Avec un système d'ajout de l'oxygène sous forme dissoute et la recirculation des gaz, aucune perte de TCE n'a été enregistrée.
- Étudier l'immobilisation du sol sur le géotextile : l'immobilisation du sol sur le géotextile suit le modèle de l'équation suivante avec β et λ_0 égal respectivement à 1,10 et $0,02 \text{ min}^{-1}$.

$$DO = DO_0 \frac{(1 - \beta)}{e^{\lambda_0(1-\beta)t} - \beta} \quad (6)$$

4) Les essais en cuvette ont démontré que :

- La cinétique par rapport au méthane suit un modèle de Monod : Essai 1 : $K_s = 0,35 \text{ mg CH}_4 \text{ L}^{-1}$, $K = 0,013 \text{ mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ - Essai 2 : $K_s = 0,51 \text{ mg CH}_4 \text{ L}^{-1}$, $K = 0,014 \text{ mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
- Le ratio molaire de la consommation de l'oxygène sur le méthane est de 1,6:1.
- Le consortium microbien avait la capacité de dégrader le TCE en absence de méthane pour une certaine période d'environ 37 heures.

5) Les essais en mode continu ont démontré que :

- Une augmentation du taux de fourniture en CH_4 entraîne une augmentation du taux de consommation de CH_4 et diminue l'efficacité d'enlèvement du TCE par le bioréacteur.
- La réaction de dégradation du TCE suit une réaction d'ordre 1 dans la partie linéaire de Monod : $K_s = 144 \text{ mg TCE L}^{-1}$, $K = 3415 \text{ mg TCE L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.
- Le bioréacteur à sol immobilisé avec consortium méthanotrophe peut dégrader le TCE jusqu'à un taux d'au moins $230 \text{ mg TCE L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

6) En général, les taux de dégradation du TCE et les efficacités obtenus à partir du réacteur à sol immobilisé sont très supérieurs à ceux obtenus avec d'autres types de bioréacteurs utilisant des consortia méthanotrophes.

4.2 Recommandations sur le procédé de réacteur à sol immobilisé

1) Problème du tétrachloroéthylène (PCE)

Le PCE ne peut pas être dégradé par les bactéries méthanotrophes, ce qui occasionne un certain problème. Habituellement, on trouve du PCE au même endroit que le TCE. Pour contrer ce problème, on peut ajouter une autre unité juste avant le réacteur à sol immobilisé. Plusieurs cultures pures connues de bactéries anaérobies peuvent déshalogéner le PCE en TCE (Fatherpure et al., 1987). Des études effectuées par Sharma et McCarty (1996) ont permis d'isoler une nouvelle souche MS-1 de bactéries aérobies facultatives qui peut transformer le PCE en cis-1,2-DCE via le TCE. Cette recherche offre deux avantages : d'abord le procédé est aérobie et deuxièmement le composé cis-1,2-DCE est facilement décomposable par les méthanotrophes (Fennel et al., 1992).

2) Développement de modèle

La difficulté de développer des modèles provient de la difficulté d'étudier la quantité de biomasse sur le géotextile en fonction du temps et d'analyser cette population. Il serait intéressant de partir plusieurs réacteurs en même temps avec la même quantité de sol et de suivre le développement du biofilm poussant sur le géotextile en arrêtant un réacteur à la fois pour vérifier la quantité de biomasse formée.

3) Possibilité d'un procédé pour le traitement industriel :

- Au niveau industriel, d'un point de vue économique, un traitement combiné pour la dégradation du TCE est souhaitable. Le réacteur à sol immobilisé avec consortium méthanotrophe peut être combiné avec un biofiltre méthanotrophe pour traiter la sortie d'air (figure 4.1).

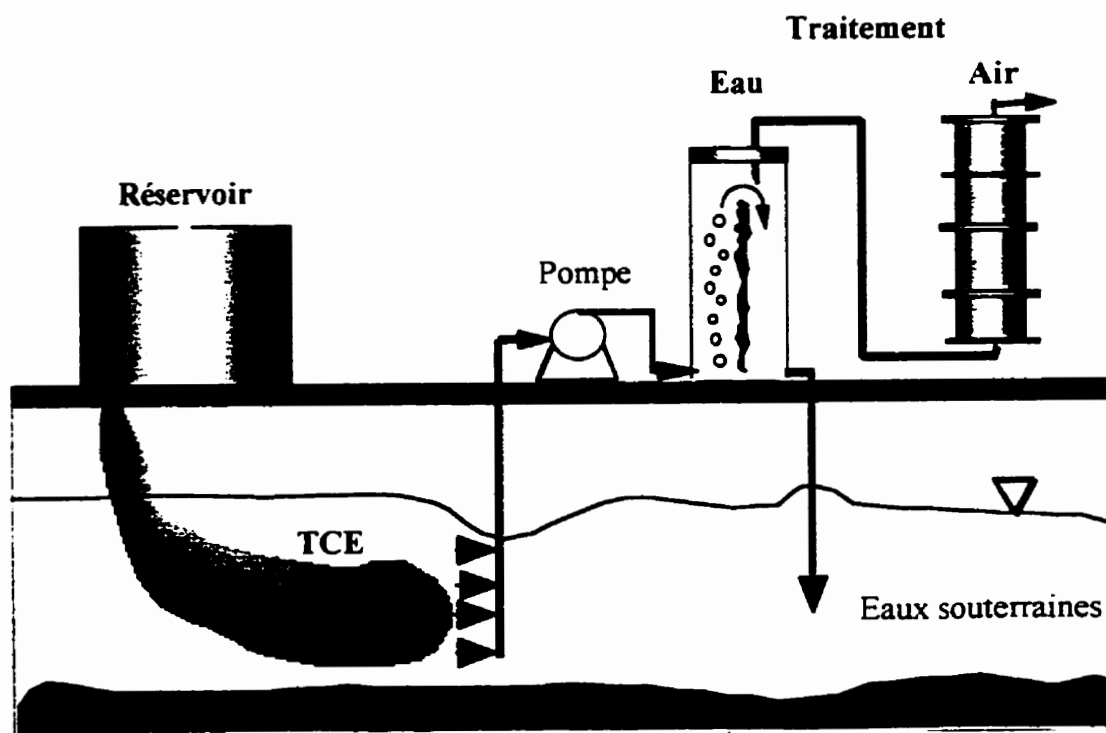


Figure 4-1 Traitement combiné bioréacteur à sol immobilisé et unité de biofiltration avec consortium méthanotrophe pour application industrielle

4.3 Recommandations scientifiques et techniques

- 1) Pour confirmer les deux souches de bactéries méthanotrophes obtenues, il faudrait effectuer une analyse de séquence de l'ARNr 16S et une analyse des acides gras.
- 2) Pour l'alimentation du réacteur en TCE, l'utilisation d'un réservoir en acier inoxydable avec un couvercle amovible fonctionnant sur le principe du piston et qui descend au fur et à mesure que le volume du réservoir descend évitera la formation d'un headspace. Ceci empêcherait la volatilisation du TCE dans la partie supérieure du réservoir. De plus, une agitation à l'intérieur du réservoir permettrait une bonne répartition du contaminant. Cette solution serait préférable au sac en Teflon[®], même si avec le sac il n'y avait pas de formation d'headspace, ou à l'utilisation d'une tourie qui comporte un headspace impressionnant.
- 3) Pour l'ajout du méthane, il serait préférable d'avoir une alimentation constante pour éviter les oscillations de concentration en utilisant par exemple un contrôleur de débit massique. Pour la période d'acclimatation du consortium microbien, le méthane pourrait être bullé dans l'unité de l'ajout des nutriments et envoyé sous forme dissoute dans le réacteur.

- 4) Vérifier la possibilité d'augmenter le taux de dégradation du TCE en optimisant la quantité de sol fixé sur le géotextile ou en augmentant la surface du géotextile.
- 5) Étudier la dégradation du TCE à des concentrations supérieures.

Bibliographie

ARVIN, Erik. (Juillet 1991). Biodegradation kinetics of chlorinated aliphatic hydrocarbons with methane-oxidizing bacteria in an aerobic fixed biofilm reactor. Water Research **25** : 873-881.

ASENJO, Juan A. et SUK, Julie S. (1985). Kinetics and models for the bioconversion of methane into an intracellular polymer, Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB). Biotechnology and Bioengineering Symposium, **15** : 225-234.

ASENJO, Juan A. et SUK, Julie S. (1986). Microbial conversion of methane into Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) : Growth and intracellular product accumulation in a type II Methanotroph. J. Ferment. Technol., **64**(4) : 271-278.

AZIZ, Carol E., FITCH, Mark W., LINQUIST, Larry K., PRESSMAN, Jonathan G., GEORGIU, George et SPEITEL Jr, Gerald E. (1995). Methanotrophic biodegradation of trichloroethylene in a hollow fiber membrane bioreactor. Environmental Science & Technology, **29**(10) : 2574-2583.

BAILEY, James E. et OLLIS, David F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals, second edition. McGraw-Hill inc., USA, 984 p.

BELLAR, T.A. et LICHTENBERG, J.J. (Décembre 1974). Determining volatile organics at microgram-per-litre levels by gas chromatography. Research Journal AWWA, **66** : 739-744.

BOIESEN, Anette, ARVIN, Erik et BROHOLM, Kim. (1993). Effect of mineral nutrients on the kinetics of methane utilization by methanotrophs. Biodegradation, 4 : 163-170.

BOWMAN, John P., JIMÉNEZ, Luis, ROSARIO, Ingrid, HAZEN, Terry C. et SAYLER, Gary S. (Août 1993a). Characterization of the methanotrophic bacterial community present in a trichloroethylene-contaminated subsurface groundwater site. Applied and Environmental Microbiology, 59(8) : 2380-2387.

BOWMAN, John P. et SAYLER, Gary S. (1994). Optimization and maintenance of soluble methane monooxygenase activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b. Biodegradation, 5 : 1-11.

BOWMAN, John P., SLY, Lindsay I, NICHOLS, Peter D. et HAYWARD A. C. (Octobre 1993b). Revised taxonomy of the methanotrophs : Description of *Methylobacter* gen. nov., Emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. International Journal of Systematic Bacteriology, 43(4) : 735-753.

BROCK, T.D., SMITH, D. W. et MADIGAN, M.T. (1984). Biology of Microorganisms, 4th ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.

BROHOLM, Kim, CHRISTENSEN, Thomas H. et JENSEN, Bjorn K. (1992). Modelling TCE degradation by a mixed culture of methane-oxidizing bacteria. Water Research, 26(9) : 1177-1185.

BRUSSEAU, Gregory, A., TSIEN, Hsien-Chyang, HANSON, Richard S. et WACKETT, Lawrence P. (1990). Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and the use of a colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity. Biodegradation, 1 : 19-29.

BURROWS, Karen J., CORNISH, Alex, SCOTT, David et HIGGINS, I. John. (1984). Substrate specificities of the soluble and particulate methane mono-oxygenases of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Journal of General Microbiology, 130 : 3327-3333.

CHU, Kung-Hui et ALVAREZ-COHEN, Lisa. (1996). Trichloroethylene degradation by methane-oxidizing cultures grown with various nitrogen sources. Water Research, 68(1) : 76-82.

CORNISH, A., NICHOLS, K. M., SCOTT, D., HUNTER, B. K., ASTON, W. J., HIGGINS, I. J. et SANDERS, J. K. M. (1984). In vivo ¹³C NMR investigations of methanol oxydation by the obligate methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. Journal of General Microbiology, 130 : 2565-2575.

COYLE, Charles G., PARKIN, Gene F. et GIBSON, David T. (1993). Aerobic, phenol-induced TCE degradation in completely mixed, continuous-culture reactors. Biodegradation, 4 : 59-69.

CUDAHY, James J. et EICHER, Anthony R. (1989). Thermal remediation industry, markets, technologies, companies. Pollution Engineering, 21(12) 76-80.

DALTON, Howard et LEAK, David J. (1985). Methane oxidation by microorganisms. Microbial gas metabolism : Mechanistic, metabolic and biotechnological aspects, chapitre 11, pp. 173-200.

DAVIS, Karen J., CORNISH, Alex et HIGGINS, I. John. (1987). Regulation of the intracellular location of methane mono-oxygenase during growth of *Methylosinus trichosporium OB3b* on methanol. Journal of General Microbiology, 133 : 291-297.

DELUCCA, S. J., CHAO, A.C., ASCE, M. et SMALLWOOD Jr C. (1983). Removal of organic priority pollutants by oxydation coagulation. Journal of Environmental Engineering, 109 : 36-46.

FAN, Shifang et SCOW, Kate M. (Juin 1993). Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. Applied and Environmental Microbiology, 59(6) : 1911-1918.

FATHERPURE, B.Z., NENGU, J.P. et BOYD, S.A. (1987). Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene. Applied and Environmental Microbiology, 53 : 2671-2674.

FENNELL, Donna E., NELSON, Yarrow M., UNDERHILL, Sheila E., WHITE, Thomas E. et JEWELL, William J. (Septembre 1993). TCE degradation in a methanotrophic attached-film bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 42(7) : 859-872.

FENNELL, Donna E., UNDERHILL, Sheila E. et JEWELL William J. (Décembre 1992). Methanotrophic attached-film reactor development and biofilm characteristics. Biotechnology and Bioengineering, 40(10) : 1218-1232.

FLIERMANS, C. B., PHELPS, T. J., RINGELBERG, D., MIKELL, A. T. et WHITE, D. C. (Juillet 1988). Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic enrichment cultures. Applied and Environmental Microbiology, 54(7) : 1709-1714.

FOGEL, M. M., TADDEO, A. R. et FOGEL, S. (Avril 1986). Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. Applied and Environmental Microbiology, 51(4) : 720-724.

FOGLER, H. Scott. (1992). Elements of Chemical Reaction Engineering, second edition. Prentice Hall, inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 838 p.

FOX, Brian G., BORNEMAN, James G., WACKETT, Lawrence P. et LIPSCOMB, John D. (1990). Haloalkene oxidation by the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium OB3b* : Mechanistic and environmental implications. Biochemistry, 29 : 6419-6427.

FOX, Brian G., FROLAND, Wayne A., DEGE, Jay E. et LIPSCOMB, John D. (15 juin 1989). Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium OB3b*. The Journal of Biological Chemistry, 264(17) : 10023-10033.

FOX, Brian G., HENDRICH, Michael P., SURERUS, Kristene K., ANDERSSON, Kristoffer K., FROLAND, Wayne A., LIPSCOMB, John D. et MÜNCK, Eckard. (1993). Mössbauer, EPR, and ENDOR studies of the Hydroxylase and Reductase components of methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium OB3b*, J. Am. Chem. Soc., 115 : 3688-3701.

GOUVERNEMENT du CANADA, Environnement Canada et Santé Canada. (1993). Trichloroéthylène. Loi canadienne sur la protection de l'environnement. 55 p.

Guide de la chimie international. (1976). Éditions SEP, Paris.

GRAHAM, David W., KORICH, Dick G., LeBLANC, Ronald P., SINCLAIR, Norval A. et ARNOLD Robert G. (Juillet 1992). Applications of a colorimetric plate assay for soluble methane monooxygenase activity. Applied and Environmental Microbiology, : 2231-2236.

HANSON, Richard S. et HANSON, Thomas E. (Juin 1996). Methanotrophic Bacteria. Microbiological Reviews, 60(2) : 439-471.

HAZEN, Terry C., LOONEY, B. B., ENZIEN, M., FRANCK, M., FLIERMANS, C. B. et EDDY, C. A. (1993). *In situ* bioremediation via horizontal wells. Proceedings of the symposium on engineering hydrology, San Francisco Ca. : 862-867.

HENRY, Susan M. et GRBIC-GALIC, Dunja. (Janvier 1991). Influence of endogenous and exogenous electron donors and trichloroethylene oxidation toxicity on trichloroethylene oxidation by methanotrophic cultures from a groundwater aquifer. Applied and Environmental Microbiology, 57(1) : 236-244.

HENRYSSON, Thomas et McCARTY, Perry L. (Mai 1993). Influence of the endogenous storage lipid Poly- β -Hydroxybutyrate on the reducing power availability during cometabolism of trichloroethylene and naphthalene by resting methanotrophic mixed cultures. Applied and Environmental Microbiology, 59(5) : 1602-1606.

HENSON, Michael J., YATES, M.V., COCHRAN, J.W. et SHACKLEFORD, D.L. (1988). Microbial removal of halogenated methanes, ethanes and ethylenes in an aerobic soil exposed to methane. FEMS Microbiology Ecology, 53 : 193-201.

KARAMANEV, Dimitar G., CHAVARIE, Claude et SAMSON, Réjean. (1996a). Soil immobilisation : A new concept for biotreatment of soil contaminants. Biotechnology and Bioengineering. soumis.

KARAMANEV, Dimitar G., CHAVARIE, Claude et SAMSON, Réjean. (1996b). Hydrodynamics and mass transfer in an airlift reactor with a semipermeable draft tube. Chemical Engineering Science, **51**(7), 1173-1176.

KARAMANEV, Dimitar G., CHAVARIE, Claude et SAMSON, Réjean. (Juillet 1996c). Hydrodynamic and mass transfer study of the immobilized soil bioreactor. 5th World Congress of Chemical Engineering, San Diego.

KARAMANEV, Dimitar G., CHAVARIE, Claude et SAMSON, Réjean. (Mai 1997). Hydrodynamics of soil immobilization in the immobilized soil bioreactor. AIChE Journal, **43**(5), 1163-1170.

KARAMANEV, D. G. et NIKOLOV, L. N. (1991). A comparison between the reaction rates in biofilm reactors and free suspended cells bioreactor. Bioprocess Engineering, **6** : 127-130.

KIM, Y., SEMPRINI, L., et ARP, D. J. (Mai 1997). Aerobic cometabolism of chloroform, 1,1,1-trichloroethane, 1,1-dichloroethylene and other chlorinated aliphatic hydrocarbons by butane-utilizing microorganism. 97th General Meeting ASM, Miami Beach, Florida, USA, 473.

KOIZUMI, Jun-Ichi et KITAYAMA, Atsushi. (1995). TCE degradation by toluene/benzene monooxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* J1104 and *Escherichia coli* recombinant. Bioremediation of Chlorinated Solvents, **3**(4) : 197-201.

LANZARONE, Nancy A. et McCARTY, Perry L. (Novembre-décembre 1990). Column studies on methanotrophic degradation of trichloroethylene and 1,2-dichloroethane. Ground Water, 28(6) : 910-919.

LEAHY, Joseph G., BYRNE, Armando M. et OLSEN, Ronald H. (Mars 1996). Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 62(3) : 825-833.

LIPSCOMB, John D. (1994). Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. Ann. Rev. Microbiol., 48 : 371-399.

LITTLE, C. Deane, PALUMBO, Anthony V., HERBES, Stephen E., LIDSTROM, Mary E., TYNDALL, Richard L. et GILMER, Penny J. (Avril 1988). Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. Applied and Environmental Microbiology, 54(4) : 951-956.

LIU, Y., NESHEIM, J. C., PAULSEN, K. E., STANKOVICH, M. T. et LIPSCOMB, J. D. (1997). Roles of the methane monooxygenase reductase component in the regulation of catalysis. Biochemistry, 36(17), 5223-5233.

LU, Chih-Jen, CHANG, Chu-Yin et LEE, Chi-Mei. (1995). Aerobic biodegradation of trichloroethylene by microorganisms that degrade aromatic compounds. Bioremediation of Chlorinated Solvents, 3(4) : 1-7.

MACKAY, Donald et SHIU, Wan Ying. (1981). A critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. J. Phys. Chem. Ref. Data, 10(4) : 1175-1199.

MAHAFFEY, William R., CAMPEAU, Geoff et KINSELLA, John. (Octobre 1991). Developing strategies for PAH and TCE bioremediation. Water Environment & Technology, Groundwater, 3(10) : 83-88.

MAHAFFEY, William R., CAMPEAU, Geoff et KINSELLA, John. (Février 1992). TCE bioremediation. Water Environment & Technology, Groundwater, 4(2) : 48-51.

MARS, Astrid E., HOUWING, Joukje, DOLFING, Jan et JANSSEN, Dick B. (Mars 1996). Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. Applied and Environmental Microbiology, 62(3) : 886-891.

McFARLAND, Michael J., VOGEL, Catherine M. et SPAIN, Jim C. (Février 1992). Methanotrophic cometabolism of trichloroethylene (TCE) in a two stage bioreactor system. Water Research, 26(2) : 259-265.

MEF (1996). Projet de politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, Gouvernement du Québec.

MERCK Index. (1996). An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 12 édition, Whitehouse Station, New Jersey.

MORAN, B.N. et HICKEY, W.J. (Octobre 1997). Trichloroethylene biodegradation by mesophilic and psychrophilic ammonia oxidizers and methanotrophs in groundwater microcosms. Applied and Environmental Microbiology, 63(10) : 3866-3871.

OLDENHUIS, Roelof, VINK, Ruud L. J. M., JANSSEN, Dick B. et WITHOLT, Bernard. (Novembre 1989). Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium OB3b* expressing soluble methane monooxygenase. Applied and Environmental Microbiology, **55**(11) : 2819-2826.

OTTE, M.-P., GAGNON, J., COMEAU, Y., MATTE, N., GREER, C.W. et SAMSON, R. (1994). The activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. Applied and Environmental Biotechnology, **40**, 926-932.

PARK, Sunghoon., HANNA, Leslie M., TAYLOR, Robert T. et DROEGE, Michael W. (Août 1991). Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium OB3b*. I: Production of soluble methane monooxygenase. Biotechnology and Bioengineering, **38**(4) : 423-433.

PARK, Sunghoon, SHAH, Nilesh N., TAYLOR, Robert T. et DROEGE, Michael W. (1992). Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium OB3b*. II: Production of particulate methane monooxygenase. Biotechnology and Bioengineering, **40** : 151-157.

PARSONS, Frances, WOOD, Paul R. et DeMARCO, Jack. (Février 1984). Transformations of tetrachloroethene and trichloroethene in microcosms and groundwater. Journal Am. Water Works Assoc., **76** : 56-59.

PELCZAR Jr., Michael J., CHAN, E.C.S. et FONTAINE Jules. (1982). Éléments de microbiologie, Les Édition HRW ltée. Montréal, Québec, 514 p.

PERRY, Robert H., GREEN, Don W. et MALONEY, James O. (1997). Perry's Chemical Engineers Handbook, 7th ed., McGraw-Hill.

PHELPS, T. J., NIEDZIELSKI, J. J., SCHRAM, R. M., HERBES, S. E. et WHITE, D.C. (Juin 1990). Biodegradation of trichloroethylene in continuous-recycle expanded-bed bioreactors. Applied and Environmental Microbiology, **56**(6) : 1702-1709.

RUSSELL, Hugh H., MATTHEWS, John E. et SEWELL, Guy W. (Janvier 1992). TCE removal from contaminated soil and ground water, EPA/540/s-92/002, 10 p.

SEMPRINI, Lewis et McCARTY, Perry L. (Mai-juin 1991). Comparison between model simulations and field results for *in-situ* biorestauration of chlorinated aliphatics : Part 1. Biostimulation of methanotrophic bacteria. Ground Water, **29**(3) : 365-374.

SEMPRINI, Lewis, ROBERTS, Paul V., HOPKINS, Gary D. et McCARTY, Perry L. (Septembre-octobre 1990). A field evaluation of *in-situ* biodegradation of chlorinated ethenes : Part 2 Results of biostimulation and biotransformation experiments. Ground Water, **28**(5) : 715-727.

SHAH, Nilesh N., PARK, Sunghoon, TAYLOR, Robert T. et DROEGE, Michael W. (1992). Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. III: Production of particulate methane monooxygenase in continuous culture. Biotechnology and Bioengineering, **40** : 705-712.

SHARMA, Pramod K. et McCARTY, Perry L. (Mars 1996). Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene. Applied and Environmental Microbiology, **62**(3) : 761-765.

STANLEY, S. H., PRIOR, S. D., LEAK, D. J. et DALTON H. (1983). Copper stress underlies the fundamental change in intracellular location of methane mono-oxygenase in methane-oxidizing organisms : studies in batch and continuous cultures. Biotechnology Letters, 5 : 487-492.

STRAND, S.E., BJELLAND, M.D. et STENSEL, H.D. (Mars-avril 1990). Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by suspended cultures of methane-oxidizing bacteria. Research Journal WPCF, 62(2) : 124-129.

TAYLOR, Robert T., DUBA, A. G., DURHAM, W. B., HANNA, M. L., JACKSON, K. J., JOVANOVIĆ, M. C., KNAPP, R. B., KNEZOVICH, J. R., SHAH, N. N., SHONNARD, D. R. et WIJESINGHE, A. M. (Décembre 1993). *In situ* bioremediation of trichloroethylene-contaminated water by a resting-cell methanotrophic microbial filter, Hydrological Sciences Journal, 38(4) : 323-342.

TSIEN, Hsien-Chyang, BRUSSEAU, Gregory A., HANSON, Richard S. et WACKETT, Lawrence P. (Décembre 1989). Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium OB3b*. Applied and Environmental Microbiology, 55(12) : 3155-3161.

USEPA. (Novembre 1990). Biotrol, inc. (Methanotrophic bioreactor system), SITE Technology Profile, : 121-122.

WACKETT, Lawrence P. et GIBSON, David T. (Juillet 1988). Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. Applied and Environmental Microbiology, 54(7) : 1703-1708.

WILSON, John T. et WILSON, Barbara H. (Janvier 1985). Biotransformation of trichloroethylene in soil. Applied and Environmental Microbiology, 49(1) : 242-243.

YOUNG, Eva C. (1997). http://www.labmed.umn.edu/umbfd/TCE/reac/tce_mechA1.gif.

Biocatalysis/Biodegradation Database, Université du Minnesota.

ANNEXES

Annexe A. Analyse du TCE par chromatographie en phase gazeuse

Pour les expériences en cuvée et en continu, les échantillons de TCE, après extraction avec une solution d'hexane (3 ml) contenant du 1,2 - dibromoéthane (1 mg L^{-1}) comme standard interne, ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse équipé d'une colonne capillaire HP-5 et d'un détecteur de capture d'électrons (DCE). Les concentrations des standards varient de 0 à 20 mg L^{-1} . À l'aide d'un injecteur automatique, $1 \text{ }\mu\text{L}$ est injecté dans le CPG-DCE. La réponse du CPG-DCE est linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,99 (Figure A.1). À tous les jours d'utilisation du CPG-DCE, 3 standards sont injectés pour pouvoir analyser la concentration des inconnues. Des échantillons sans TCE sont injectés pour vérifier le taux de récupération du standard interne puis pour vérifier si la seringue d'injection n'adsorbe pas de TCE après une injection. L'appareil a la capacité d'évaluer de très faibles quantités de TCE (jusqu'à des concentrations de $1 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$).

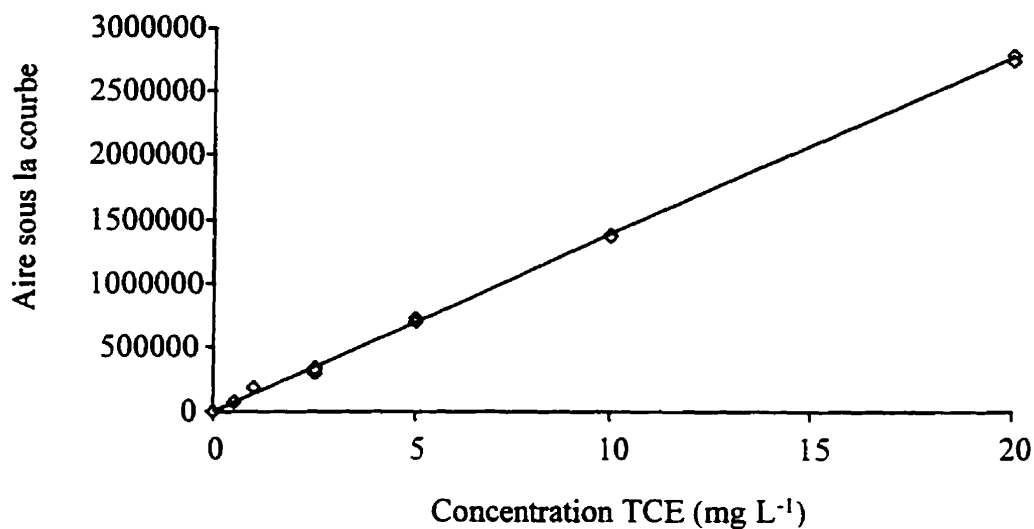


Figure A.1. Courbe de calibration du TCE

L'équation 19 a été utilisée pour calculer la concentration de TCE dans l'échantillon.

$$[\text{TCE}] = \frac{\left(\frac{\text{Aire sous la courbe du TCE}}{\text{Aire sous la courbe du 1,2 - dibromoéthane}} \right)_{\text{inc}}}{\left(\frac{\text{Aire sous la courbe de TCE}}{\text{Aire sous la courbe du 1,2 - dibromoéthane}} \right)_{\text{std}}} \cdot C_{\text{std}} \quad (19)$$

C_{std} : Concentration du standard

Annexe B. Analyse du méthane par chromatographie en phase gazeuse

Pour les expériences en cuvée et en continu, le méthane a été analysé par CPG équipé d'une colonne HP-1 et d'un détecteur d'ionisation de flamme (DIF). Les concentrations en méthane dans les échantillons ont été interprétées à l'aide d'une courbe de calibration réalisée par la préparation de standards de méthane (Arvin, 1991). Les concentrations des standards variaient de 0 à 32,8 mg L⁻¹. Pour chaque standard, un volume de 50 µL était injecté manuellement (répété de 3 à 4 fois) au CPG-DIF à l'aide d'une seringue étanche en verre équipée d'une valve en Teflon[®], pour la préparation de la courbe standard. La réponse du CPG-DIF était linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,99 (Figure B.1). Les standards étaient préparés à chaque mois. À tous les jours d'utilisation du CPG-DIF, 3 standards étaient injectés pour pouvoir analyser les concentrations inconnues. Entre chaque échantillon, un blanc (échantillon d'air environnant) doit être injecté pour être sûr de ne pas fausser les résultats suite à une adsorption de la part de la seringue ou de ses composantes (valve, aiguille). L'écart entre deux injections d'une même concentration doit être inférieur à 10 %. Si ce n'est pas le cas, on doit vérifier les paramètres de l'appareil.

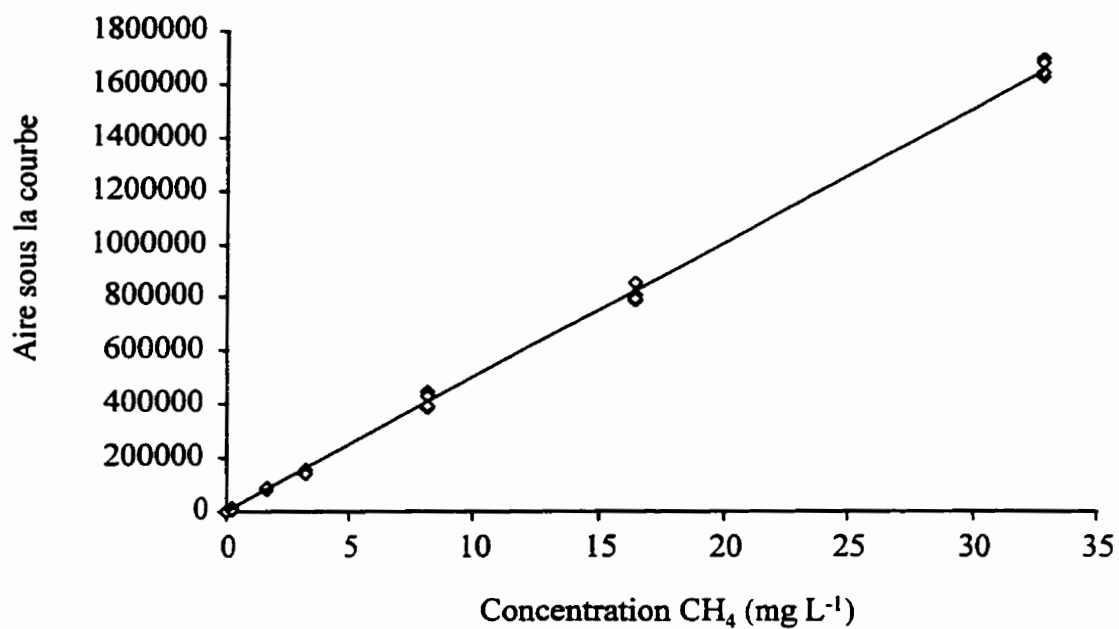


Figure B.1 Courbe de calibration du méthane

La formule suivante est employée pour calculer la concentration gazeuse

$$[\text{CH}_4]_g = \frac{\text{Aire sous la courbe}}{\text{Aire du std}} \cdot C_{\text{std}} \quad (20)$$

La concentration de méthane dissout dans la phase liquide se calcule comme suit :

$$[\text{CH}_4]_l = \frac{[\text{CH}_4]_g \cdot V_g}{V_L} \quad (21)$$

Annexe C. Calcul des incertitudes

L'écart-type a été employé comme incertitude quand il y avait plus de trois mesures effectuées (pour les essais de minéralisation et les valeurs provenant du CPG).

Toutes les autres incertitudes ont été calculé par le développement de Taylor :

Pour le calcul de la concentration du CH_4 sous forme dissoute :

$$[\text{CH}_4]_{\text{L}} = \frac{[\text{CH}_4]_{\text{g}} \bullet V_{\text{g}}}{V_{\text{L}}} \quad (22)$$

$$\Delta[\text{CH}_4]_{\text{L}} = \left| \frac{V_{\text{g}}}{V_{\text{L}}} \right| \Delta[\text{CH}_4]_{\text{g}} + \left| \frac{[\text{CH}_4]_{\text{g}}}{V_{\text{L}}} \right| \Delta V_{\text{g}} + \left| -\frac{[\text{CH}_4]_{\text{g}} \bullet V_{\text{g}}}{V_{\text{L}}^2} \right| \Delta V_{\text{L}} \quad (23)$$

Calcul du débit liquide et de son incertitude :

$$\nu = \frac{V}{t} \quad (24)$$

$$\Delta \nu = \left| \frac{1}{t} \right| \Delta V + \left| -\frac{V}{t^2} \right| \Delta t \quad (25)$$

Calcul du temps de résidence et de son incertitude :

$$\tau = \frac{V}{\nu} \quad (26)$$

$$\Delta \tau = \left| \frac{1}{\nu} \right| \Delta V + \left| -\frac{V}{\nu^2} \right| \Delta \nu \quad (27)$$

Calcul du taux de biodégradation du TCE et de son incertitude

$$\text{Taux} = \frac{[\text{TCE}]_{\text{inR}} - [\text{TCE}]_{\text{outR}}}{V_R} \quad \nu = \frac{[\text{TCE}]_{\text{inR}} - [\text{TCE}]_{\text{outR}}}{\tau} \quad (28)$$

$$\Delta \text{taux} = \left| \frac{1}{\tau} \right| \Delta [\text{TCE}]_{\text{inR}} + \left| -\frac{1}{\tau} \right| \Delta [\text{TCE}]_{\text{outR}} + \left| -\frac{[\text{TCE}]_{\text{inR}} - [\text{TCE}]_{\text{outR}}}{\tau^2} \right| \Delta \tau \quad (29)$$

Calcul de l'efficacité et de son incertitude :

$$\text{Efficacité} = \left(\frac{[\text{TCE}]_{\text{inR}} - [\text{TCE}]_{\text{outR}}}{[\text{TCE}]_{\text{inR}}} \right) \times 100 \quad (30)$$

$$\Delta \text{Efficacité} = \left(\left| \frac{[\text{TCE}]_{\text{outR}}}{[\text{TCE}]_{\text{inR}}^2} \right| \Delta [\text{TCE}]_{\text{inR}} + \left| -\frac{1}{[\text{TCE}]_{\text{inR}}} \right| \Delta [\text{TCE}]_{\text{outR}} \right) \times 100 \quad (31)$$

Annexe D : Calcul du Peclet

Le calcul du Peclet a été effectué dans le but de vérifier que l'unité de méthanation était complètement mélangée. De la fluorescéine a été utilisée comme traceur, mesurée à l'aide de la DO à 494 nm. Pour l'agitation minimale (50 tr min^{-1}) et le débit d'alimentation (25 ml min^{-1}) le plus faible, la DO a été suivie et a été illustrée sous forme F_θ qui correspond à la DO mesurée divisée par la DO maximale atteinte (Figure D.1). Puis E_θ (Figure D.2) a été obtenu en dérivant F_θ en fonction de θ par l'équation 32. θ (équation 33) est un nombre adimensionnel qui correspond au temps de la prise d'échantillon divisé par le temps moyen (équation 36).

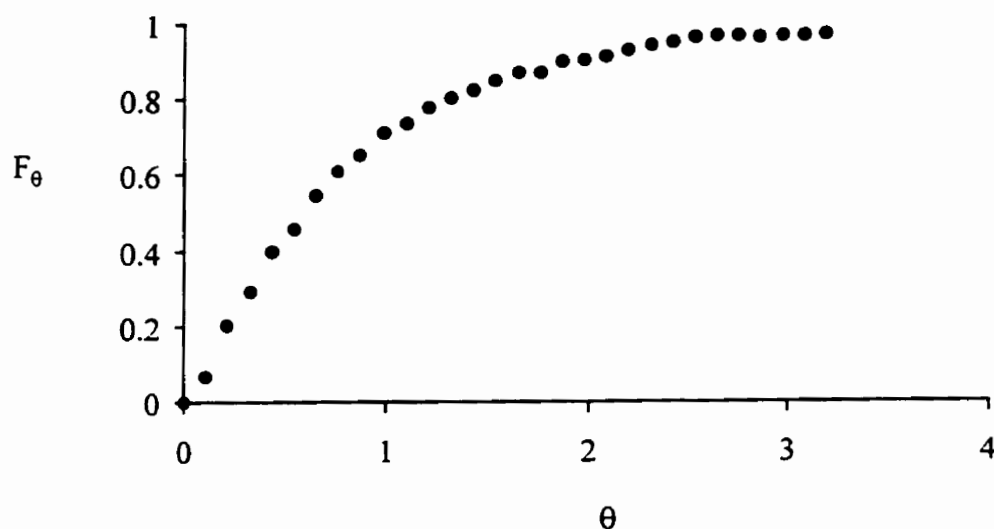


Figure D.1. F_θ en fonction de θ

$$E_{\theta} = \frac{dF_{\theta}}{d\theta} \quad (32)$$

$$\theta = \frac{t}{\bar{t}} \quad (33)$$

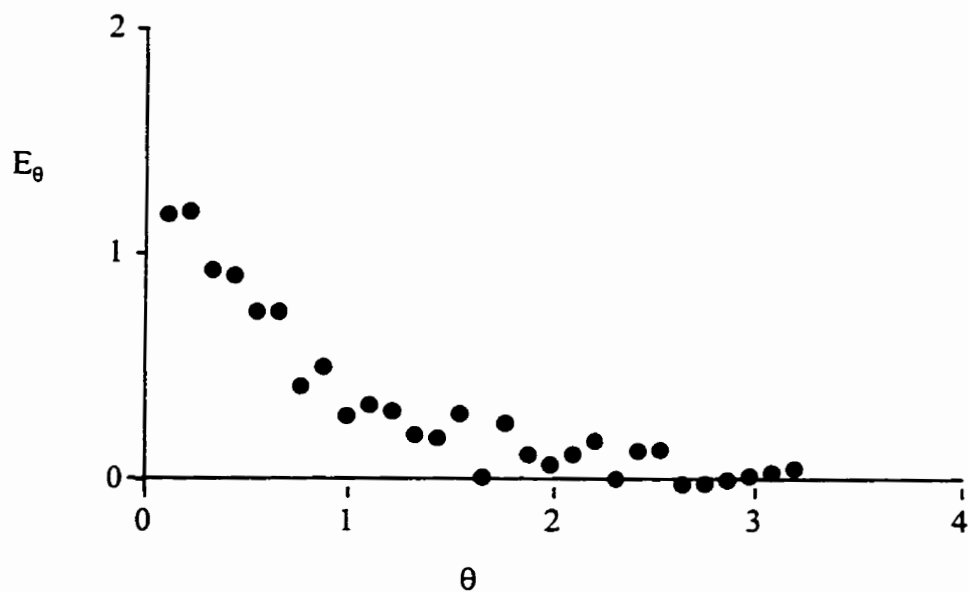


Figure D.2. E_{θ} en fonction de θ

Le Peclet a été calculé par la suite à l'aide des équations suivantes :

$$Pe = \frac{2}{\sigma_{\theta}^2} \quad (34)$$

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{t}^2} \quad (35)$$

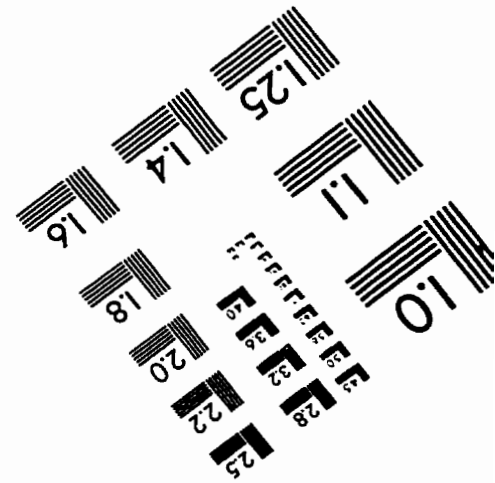
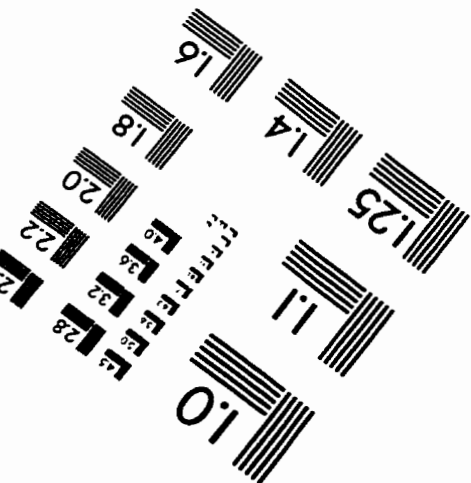
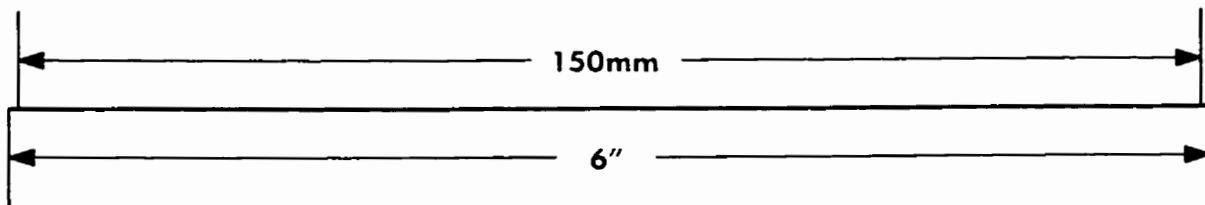
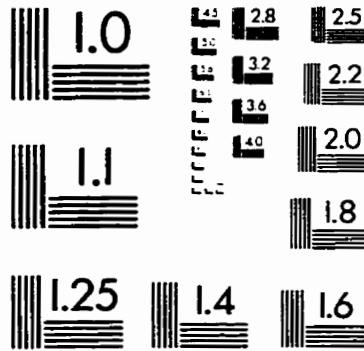
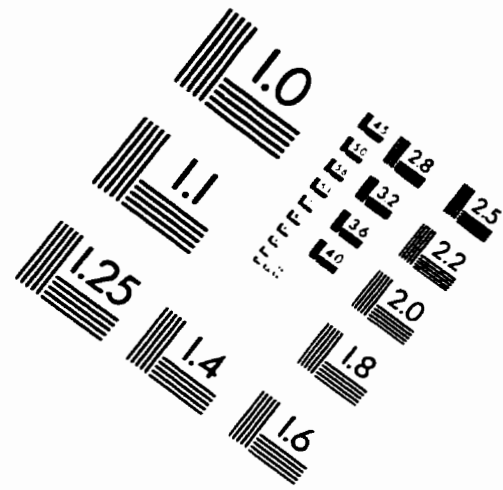
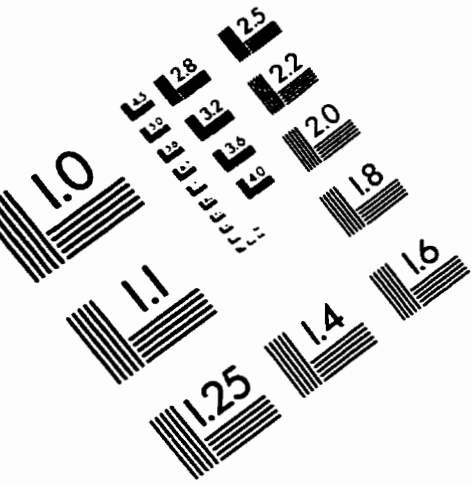
$$\bar{t} = \sum t_i E_i \Delta t \quad (36)$$

$$\sigma^2 = \sum t_i^2 E_i \Delta t - \bar{t}^2 \quad (37)$$

Annexe E. Méthode pour évaluer la quantité de sol utilisé

Le sol utilisé était marécageux et très humide. Voici la procédure effectuée pour déterminer la quantité de sol tamisé. Le sol a été tamisé avec un tamis (VWR Scientific) d'ouverture de 2 mm (pour enlever les morceaux d'arbre, de feuilles...) à l'intérieur d'une chaudière contenant de l'eau pour faciliter le passage du sol. Le tout a été tamisé à nouveau avec un tamis d'ouverture de 0,150 mm (en ajoutant de l'eau au besoin). Le sol avec le liquide a été récupéré dans un bécher et agité. 20 ml d'échantillon ont été centrifugés (centrifugeuse modèle J2-20 Beckman) durant 15 min. à 10 000 tr/min. Le surnageant a été décanté, de l'eau déionisée a été ajoutée pour laver le sol puis le tout centrifugé une deuxième fois. Le sol a été récupéré dans une coupelle d'aluminium prépesée et mis au four à 105 °C. Ensuite, la quantité de sol obtenue pour 20 ml a été mesurée puis une règle de trois a été utilisée pour connaître la quantité totale de sol contenue dans le bécher.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved